DIE STRUKTUR DER POLYENARTIGEN ANTIBIOTIKA α- UND ß-LIPOMYCIN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kurt Schabacher
aus Swinemünde

Göttingen 1973

DIE STRUKTUR DER POLYENARTIGEN ANTIBIOTIKA α- UND ß-LIPOMYCIN

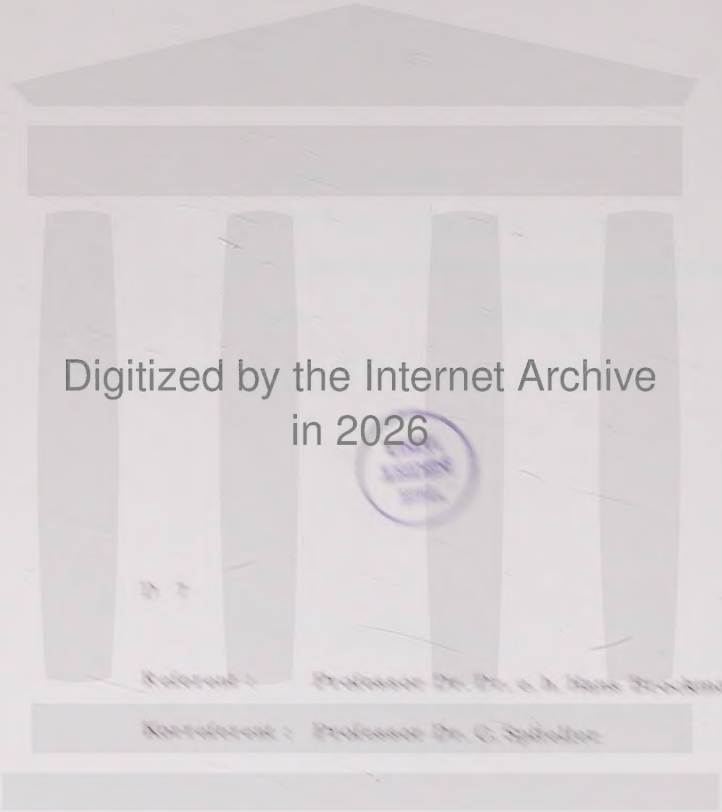
Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kurt Schabacher
aus Swinemünde

Göttingen 1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41534919_0054

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von Februar 1970 bis November 1972 unter Leitung von Herrn Dr. A. Zeeck durchgeführt.

Herrn Dr. A. Zeeck danke ich für die interessante Aufgabenstellung sowie für seine engagierte Teilnahme an meiner Arbeit, zu deren Gelingen seine Bemühungen und Ideen wesentlich beitrugen.

Herrn Prof. Dr. Dr. e. h. Hans Brockmann bin ich wegen großzügiger finanzieller Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

A. Theoretischer Teil

I. Einleitung und Aufgabenstellung 1

II. Isolierung und Reinigung der Lipomycine 5

III. Charakterisierung der Lipomycine 12

1) Chemische Eigenschaften 12

2) α- und ß-Lipomycin-methylester 13

3) Summenformel und Mol.-Gewicht 13

IV. Spektroskopische Befunde 16

1) IR-Spektren 16

2) ^{1}H-NMR-Spektren der Lipomycine 17

3) PFT-^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins 21

A. Allgemeines zur ^{13}C-NMR-Spektroskopie 21

B. Erläuterungen zum PFT ^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins 23

V. Ermittlung der Struktur 27

1) Allgemeines 27

2) Der Zucker des α-Lipomycins 28

A. Darstellung und allgemeiner Nachweis der Methylglykoside 28

B. Gaschromatographische Trennung und Massenspektren der TMS-Äther der Methylglykoside 29

C. Vergleich des α-Lipomycinzuckers mit anderen 2,6-Didesoxyhexosen durch Dünnschicht- und Gaschromatographie 34

D. Konformationsanalyse durch ^{1}H-NMR-Spektrum 41

E. Absolute Konfiguration 44

3) Der Lipomycin-Chromophor 45

A. Elektronenspektren 45

B. Reduktion mit Lithiumalanat 53

C. Katalytische Hydrierung 54

4) Oxidativer Abbau der Lipomycine 64

A. Die Struktur der Pentaenseitenkette 64

1. Allgemeines 64

2. Salpetersäure-Oxidation 66

a. Reaktionsbedingungen und Trennung der Oxidationsprodukte 66

b. Summenformeln der Oxidationsprodukte und Vergleich der Retentionszeiten 67

c. Hinweise auf die Struktur verzweigter Dicarbonsäuren aus den Massenspektren 68

d. Beziehungen der Dicarbonsäuren zueinander 72

e. Die Struktur der C_{15}-Dicarbonsäure 73
1) NMR-Spektren
2) Reduktion zum Alkan

f. Erweiterung der ß-Lipomycin-Partialformel 79

g. Optische Aktivität der C_{15}-Dicarbonsäure 81

3. Chromsäure-Oxidation 83

a. Reaktionsbedingungen und Trennung der Oxidationsprodukte 85

b. Massenspektren 85

c. NMR-Spektren 88

d. Struktur der Ketocarbonsäuren 90

e. Die Struktur der ß-Lipomycin-Seitenkette 91

4. ^{1}H-NMR-Spektren und Doppelresonanzversuche 92

B. Die Struktur des heterocyclischen Rings 96

1. Reaktionsbedingungen für den Ozonabbau und Aufarbeitung der Reaktionsprodukte 98

2. Dünnschicht- und Gaschromatographie 100

3. Massenspektren 101

5) Die Struktur der Lipomycine 106

6) Nachträgliche Interpretation spektroskopischer Befunde 109

A. Das Massenspektrum des ß-Lipomycin-methylesters 109

B. Interpretation des PFT-^{13}C-NMR-Spektrums von ß-Lipomycin 113

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse 120

B. Beschreibung der Versuche 122

C. Literaturverzeichnis 153

I. Einleitung und Aufgabenstellung

Streptomyces aureofaciens (Stamm Tü 117) wurde aus einer in Venezuela gesammelten Erdprobe isoliert *). Dieser Stamm produziert gelbrote, lipophile Antibiotika, die sich mit Aceton aus dem Mycel extrahieren lassen. Erste Untersuchungen mit den Rohextrakten zeigten, daß die biologisch aktiven Komponenten das Wachstum gram-positiver Bakterien hemmen und daß die antibiotische Aktivität auf kompletten Nährböden deutlich geringer ist, als auf chemisch definierten. Dies bedeutet, daß bestimmte im kompletten Nährmedium vorhandene Substanzen die Antibiotika unwirksam machen, also als Antagonisten auftreten. Damit gehören die neuen Antibiotika zur Gruppe der Verbindungen, die im Rahmen von Antagonismus-Tests aufgefunden wurden [1] und deren chemische wie biochemische Bearbeitung sich in den letzten Jahren als lohnend erwies.

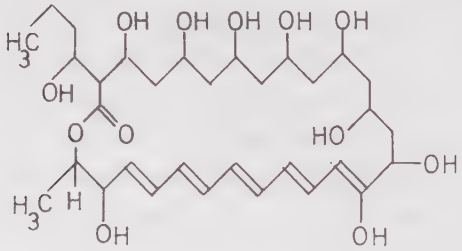
Erste Untersuchungen zur Wirkungsweise der neuen Verbindung ergaben [2], daß die antibiotische Aktivität durch Hühnereigelb aufgehoben wird, und zwar lediglich durch die chloroformlösliche Lipidfraktion. Verantwortlich dafür sind Phospholipide (u. a. Lecithin) und Isoprenlipide (u. a. Ergosterin), wie sich durch Versuche mit chemisch definierten Lipiden zeigen ließ. Wegen dieser Befunde wurden die neuen Antibiotika Lipomycine genannt. Später stellte sich heraus, daß der Streptomyces-Stamm überwiegend das Glykosid α-Lipomycin produziert, während das um den Faktor drei weniger wirksame ß-Lipomycin (Aglykon) durch saure Hydrolyse aus α-Lipomycin hervorgeht.

---

*) Der Stamm Tü 117 wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Zähner (Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen) zur Bearbeitung überlassen.

Chemische Voruntersuchungen ergaben, daß der Chromophor der Lipomycine eine Polyenkette enthält. Dies war umso bemerkenswerter, weil alle bisher bekannten Polyen-Antibiotika vornehmlich Pilze und Hefen in ihrem Wachstum hemmen und nur vereinzelt darüber hinaus auch Bakterien angreifen. Polyen-Antibiotika zeigen, soweit ihre Struktur bekannt ist, wiederkehrende Strukturelemente. In einem großen Makrolidring steht einer unpolaren Molekülregion (Polyenkette mit vier bis acht Doppelbindungen) eine polare gegenüber (Häufung von Hydroxylgruppen). Zusätzlich können Carboxylgruppen und ein Aminozucker am Ring hängen, weshalb einige Polyen-Antibiotika amphoter sind. Als Beispiel für ein typisches Polyen-Antibiotikum sei Filipin angegeben [3]. Der Wirkort dieser Antibiotika ist die Cytoplasmamembran. Der primär schädigende Effekt bei Hefen und Pilzen beruht auf der Bindung an die Membran-Steroide ; dadurch ändern sich die Permeabilitätseigenschaften der Zellmembran [4, 5].

Filipin



Den Lipomycinen fehlen die antifungischen Eigenschaften (minimale Hemmkonzentration des α-Lipomycin gegen Bac. subtilis :

1-3 µg/ml, gegen Chlostridium pasteurianum : 0,1-0,3 µg/ml. Dieser Unterschied ließ vermuten, daß die Lipomycine nicht zur großen Klasse der Polyen-Antibiotika zu rechnen sind und am ehesten mit den polyenartigen Antibiotika Ochramycin[6] und Oleficin[7], das erst gegen Ende meiner Arbeit bekannt wurde, zu vergleichen sind. Während Ochramycin (ein Octaen) keine Ähnlichkeit mit α-Lipomycin hat, deuten die bisher für das Oleficin vorliegenden Daten auf eine Verwandtschaft mit α-Lipomycin hin. Durch direkten Substanzvergleich konnte die Identität von α-Lipomycin und Oleficin jedoch ausgeschlossen werden. Von Ochramycin und Oleficin sind außer einer Beschreibung keine Daten zur Konstitution bekannt geworden. Zu erwarten ist jedoch, daß sich für alle drei Moleküle auch in der chemischen Struktur deutliche Abweichungen gegenüber den typischen Polyen-Antbiotika ergeben.

Parallel zur Konstitutionsermittlung wurde die biologische Wirkung des α-Lipomycins eingehender untersucht[2]. Der beobachtete Antagonismus und die Bindung des Antibiotikums an isolierte Cytoplasmafragmente von Bac. subtilis lassen vermuten, daß sich α-Lipomycin an die Lipide der Membran bindet. Dadurch wird die Membranstruktur verändert, und es kommt zur beobachteten Lyse der Zellen. Die Aufhebung der antibiotischen Wirkung von α-Lipomycin bei Bac. subtilis durch zugesetzte Lipide würde dann darauf beruhen, daß die Lipide α-Lipomycin außerhalb der Zelle binden oder einen Lipidfilm um die Zelle bilden, der das Vordringen des α-Lipomycins zur Cytoplasmamembran verhindert. Die Antagonisten-Wirkung tritt auch auf, wenn aus Bac. subtilis isolierte Lipide verwendet werden : die Wirkung wird offenbar besser, wenn in den Phospholipiden ein größerer Anteil ungesättigter Fettsäuren enthalten ist.

Da der Wirkort des α-Lipomycins vermutlich die Cytoplasmamembran ist, könnte eine detaillierte Kenntnis seiner Wirkungsweise wichtige Hinweise auf die Struktur und Funktion von Membranen

geben. Bisher haben sich andere Antibiotika, die an Membranen wirken (Ionophore, Polymyxine, Polyene [4,5]), als wichtige Hilfssubstanzen in der Membranforschung erwiesen. Vorbedingung für weitere Arbeiten in dieser Richtung ist jedoch, daß die Lipomycine in reiner Form vorliegen. Auch muß ihre Struktur bekannt sein, damit die Ergebnisse sachgerecht interpretiert werden können.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Lipomycine zu isolieren und zu charakterisieren. Dem anschließen sollte sich eine möglichst weitgehende Aufklärung der Struktur **).

**) Teile der vorliegenden Dissertation sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten :

B. Kunze, K. Schabacher, H. Zähner und A. Zeeck, Arch. Mikrobiol. 86, 147 (1972).

II. Isolierung und Reinigung der Lipomycine

Streptomyces aureofaciens (Stamm Tü 117) wurde auf M_2-Agar vorgezogen. Als Impfmaterial für 300 bzw. 120 l Submerskulturen diente das Mycel aus jeweils 4-5 Roux-Kolben. Nach 30-60 Stdn. Wachstum (pH-Bereich 6,2 – 6,8) zeigte das Mycel eine gelbe Farbe, die sich beim Ansäuern nach gelborange vertiefte. Der Farbstoff ist mit Chloroform extrahierbar. Sein Gehalt im Extrakt(aus gleichen Mengen Kulturlösung) ist im Elektronenspektrum an der Höhe des Absorptionsmaximums bei 466 mμ ablesbar. Die hierbei erhaltenen relativen Extinktionen korrelieren in etwa mit den Hemmhofdurchmessern, die man von der gleichen Probe im Plattendiffusionstest erhält (s. Tab. 1). Nach diesen Methoden läßt sich der Zeitpunkt maximaler Antibiotikakonzentration abpassen ; danach wird das Antibiotikum offenbar wieder abgebaut.

Tab. 1 : Wachstumsverlauf einer 120 l Submerskultur

Kulturdauer	Farbe des Mycels	rel. Extinktion bei 466 mμ	Hemmhofdurchmesser im Plattendiffusionstest
24 Stdn.	farblos	---	---
29 Stdn.	gelbbraun	840	16 mm
39 Stdn.	hellgelb	960	18 mm
42 Stdn.	hellgelb	850	18 mm

Zur Aufarbeitung säuert man an (pH 2-3) und trennt Mycel und Kulturbrühe. Der Acetonextrakt des Mycels wurde nach Eindampfen mit Petroläther entfettet. Man bekam eine rotbraune pulvrige Substanz, die die antibiotisch wirksamen Komponenten enthielt (Roh-Lipomycin).

Im Kulturfiltrat war nur geringe antibiotische Aktivität nachzuweisen. Zur Kontrolle extrahierte man es mit Äthylacetat und vereinigte den Verdampfungsrückstand, sofern er Aktivität zeigte, mit dem Acetonextrakt des Mycels.

Roh-Lipomycin wurde weiter durch Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose (H^+-Form) gereinigt und vorgetrennt. Beim Eluieren mit dem System : Chloroform/Methanol (99 : 1) erschienen mehrere gelbe, eine rote Vorzone und zwei langsam wandernde rotbraune Hauptzonen. Die mehr oder minder öligen Vorzonen enthielten keine antibiotisch wirksamen Substanzen und wurden verworfen. Aus den beiden Hauptzonen (zuerst eluierte man ß- dann α-Lipomycin, bezeichnet als α- und ß-CM-Rohprodukt) wurden amorphe dunkelrote Substanzen isoliert. Im Plattendiffusionstest gaben sie Hemmhöfe bis zu 30 mm (1 mg/ml) ; die Absorptionsbande bei 466 mμ erreichte Werte von $E^{1\%}_{1\,cm}$ = 750 maximal. Die so erhaltenen Präparate waren zu 60-80% angereichert und konnten in manchen Fällen, z. B. zu Abbaureaktionen, als Ausgangssubstanz verwendet werden.

Das Gewichtsverhältnis der α- und ß-CM-Rohprodukte mit α- und ß-Lipomycin war von Ansatz zu Ansatz verschieden. Es schwankte zwischen ca. 1 : 1 und 10 : 1 . Offensichtlich spielen hier unterschiedliche Säurekonzentrationen während der Aufarbeitung eine Rolle. Nur wenn man genau darauf achtete, nicht mehr als ausreichend anzusäuern und zudem schnell aufarbeitete, überwog der Anteil des α-Lipomycins. Die Gesamtausbeute an gereinigtem α- und ß-Lipomycin lag bei den verschiedenen Ansätzen zwischen 10 und 15 mg pro Liter Kulturlösung.

Im Verlauf der Arbeit war es zunächst notwendig, die CM-Rohprodukte weiter zu reinigen. Da schon die Aufarbeitung der Submersansätze gezeigt hatte, daß Säuren zersetzend wirken, war

eine möglichst schonende Trennung in basischem oder neutralem Milieu angebracht. Chromatographie z. B. an saurem Kieselgel würde zwangsläufig zu Substanzverlusten führen.

Ein schonendes Verfahren zur Trennung empfindlicher Substanzen ist die Gegenstromverteilung. Die Suche nach geeigneten Lösungsmittelsystemen führte schließlich zur Anwendung eines Gemisches : Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/Ligroin/Methanol/Wasser (55 : 35 : 10 : 64 : 16), für das der Verteilungskoeffizient von α-Lipomycin um 1 lag. Man führte die Trennung in einer Ronor-Verteilungsapparatur [8] mit 400 Kammern durch und erhielt neben weniger sauberer Substanz ein Präparat, dessen $E^{1\%}_{1\ cm}$ (466 mμ) auf 906 angestiegen war (α-Lipomycin-V), in 40% Ausbeute.

Da die Trennung von CM-Rohprodukten durch Verteilung recht aufwendig war und nur zu 90-95% angereicherten Präparaten führte, versuchte ich in der Adsorptionschromatographie eine Alternative zu finden :

Zunächst probierte ich dünnschichtchromatographisch verschiedene Laufmittel und Adsorbentien aus. In Tab. 2 sind die zusammengestellt, die verhältnismäßig gute Ergebnisse brachten, dazu die R_F-Werte der Lipomycine und der Lipomycinester (s. u.).

An 0,5 n Oxalsäure-Kieselgel behalten die Lipomycine ihre gelbrote Farbe. In basischen Systemen färben sie sich gelb (Anion-Form) und um günstige Laufgeschwindigkeiten zu erreichen, müssen sehr polare Laufmittel eingesetzt werden. Dadurch nivellieren sich die R_F-Wertunterschiede, α- und ß-Lipomycin werden nicht mehr getrennt.

Tab. 2 : R_F-Werte der Lipomycine und ihre Methylester im Dünnschichtchromatogramm

Laufmittel	α-Lipomycin	α-Lipomycin-methylester	ß-Lipomycin	ß-Lipomycin-methylester
1) Benzol/Äther/Aceton (9 : 9 : 2) [a]	0.22	0.31	0.39	0.50
2) Chloroform/Methanol (95 : 5) [a]	0.20	0.41	0.39	0.77
3) Chloroform/Aceton (85 : 15) [a]	0.04	0.17	0.17	0.42
4) Methylenchlorid/Äther/ Benzol (1 : 1 : 1) [a]	0.08	0.17	0.25	0.35
5) Methylenchlorid/Äther/ Benzol (2 : 1 : 1) [a]	0.05	0.10	0.20	0.28
6) Methylenchlorid/Äther/ Benzol (2 : 1 : 1) [a]	–	–	0.10	0.15
7) n-Propanol/Äthylacetat/0,25 N NH_4OH (6 : 1 : 4) [b, c]	0.39 0.70	0.68 0.92	0.39 0.70	0.68 0.92
8) Äthanol/Wasser/ 25% NH_3 (8 : 1 : 1) [b, c]	0.45 0.19	0.76 0.85	0.45 0.19	0.76 0.85

a) Kieselgel G (Merck) mit 0.5 n Oxalsäure aufgeschlämmt und auf Glasplatten gestrichen, 1 Stde. bei 110° aktiviert.

b) oberer Wert : DC-Folien Kieselgel F 254/366 (Woelm)

c) unterer Wert : DC-Alufolien Aluminiumoxid F 254 (Merck)

Die Dünnschichtchromatographie an 0.5 n Oxalsäure-Kieselgel wurde im Verlauf der Arbeit als Reinheitsprüfung beibehalten. Angewandt auf die CM-Rohprodukte und α-Lipomycin-V zeigte sich, daß α-Lipomycin noch immer durch geringe Mengen ß-Lipomycin verunreinigt war. Also auch im Verlauf der Verteilung findet keine vollständige Trennung in beide Komponenten statt, ebenso nicht an CM-Cellulose. Als weitere Verunreinigungen zeigen sämtliche Proben gelbe Vorzonen sowie braune Substanzen, die am Start verbleiben.

Es wurde daher versucht, die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie auf präparative Verhältnisse zu übertragen. Anstelle von Dünnschichtplatten präparative Platten mit größerer Schichtdicke zu verwenden, erwies sich zwar als möglich, kam aber dann wegen der großen Unbeständigkeit der Lipomycine auf dem sauer aktivierten Kieselgel nicht in Frage. Wohl unter Einfluß des sauren Milieus und von Licht und Luftsauerstoff nahmen die Substanzen erst eine gelbe später immer blassere Farbe an. α- und ß-Lipomycin konnten so nicht ohne gelbe Zersetzungsprodukte isoliert werden.

Säulenchromatographie unter ähnlichen Bedingungen dagegen war mit weit weniger Substanzverlust verbunden und führte zu einheitlichen Präparaten. Positiv wirkte sich hier die weniger hohe Aktivität des Kieselgels aus, die sich optimieren ließ, so daß der polare Anteil in den Laufmitteln herabgesetzt werden konnte.

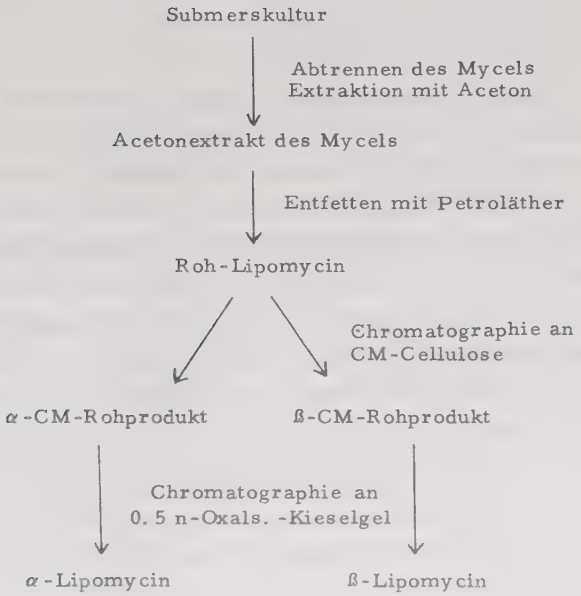
α-Lipomycin zu analytischen Zwecken, erhielt man durch Chromatographie an 0.5 n Oxalsäure-Kieselgel im System Äther/Benzol/Aceton (9 : 9 : 2). Auch hierbei fand zum Teil eine Umsetzung zu ß-Lipomycin statt, das wegen des größeren R_F-Wertes kontinuierlich aus der Hauptzone herauswanderte. Trennte man jedoch einen genügend großen Vorlauf ab, so erhielt man α-Lipomycin, dem dem Dünnschichtchromatogramm nach nur noch Spuren von ß-Lipomycin beigemengt waren.

ß-Lipomycin selbst war leichter zu reinigen. Das System Chloroform/Aceton (9 : 1) war günstig, um sämtliche gelben Begleitsubstanzen abzutrennen.

Die durch Adsorption gereinigten Präparate wurden zur Analyse in wenig Chloroform gelöst, aus Cyclohexan umgefällt und im Hochvakuum mehrere Tage bei 55-60° getrocknet. Die $E^{1\%}_{1\,cm}$-Werte betrugen dann für α-Lipomycin 950 und für ß-Lipomycin 1260. Im Plattendiffusionstest fand man einen Hemmhofdurchmesser von 30 mm (1 mg/ml). Höhere Werte wurden nie erreicht.

Mehrere Versuche wurden noch unternommen, um Verluste bei Säulenchromatographie einzuschränken : Imprägnierung des Kieselgels mit anderen organischen Dicarbonsäuren brachte keine Verbesserung. Mit 0.5 n Malonsäure-Kieselgel erreichte man keine ausreichende Trennung, auf 0.5 n Glutarsäure-Kieselgel bildete sich schon die gelbe Anionform der Lipomycine. Die in Tab. 2 genannten Systeme 4 – 6 (Methylenchlorid/Äther/Benzol) wurden erst gegen Ende der Arbeit aufgefunden und auf die Säulenchromatographie angewandt.
So läßt sich α-Lipomycin unter Verwendung von Methylenchlorid/Äther/Benzol (1 : 1 : 1) gut reinigen.
Da dieses System nur ein Drittel so viel Oxalsäure zu lösen vermag, wie das bis dahin verwendete Äther/Benzol/Aceton (9 : 9 : 2)-System, ist wegen geringerer Säurekonzentration im Laufmittel die Trennung insgesamt schonender.

Aufarbeitungs — und Reinigungsschema



III. Charakterisierung der Lipomycine

1) Chemische Eigenschaften

α- und ß-Lipomycin sind bisher nicht kristallisiert. Die aus konzentrierten Chloroformlösungen mit Cyclohexan gefällten Pulver haben keinen scharfen Schmelzpunkt (sintern ab 90° zu rotbraunen nicht fließenden Tröpfchen) und halten hartnäckig Lösungsmittel fest. Die Lipomycine sind in Chloroform, Äther, Methanol oder Aceton gut löslich, in Cyclohexan oder Wasser unlöslich. Wäßrige alkalische Lösungen (pH > 7) lösen die Antibiotika mit gelber Farbe. Die Farbverschiebung in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösungen verleiht den Lipomycinen Indikatoreigenschaften, die auch in reinen Lösungsmittel in Abhängigkeit von deren Polarität auftreten (gelbrot in Chloroform, gelb in Methanol).

Mit konzentrierter Schwefelsäure geben die Lipomycine violette Lösungen, die rasch eine schmutzig rotbraune Farbe annehmen. Die Carr-Price-Reaktion ist positiv (vergängliche Rotfärbung), Kaliumpermanganat- und Bromlösungen werden entfärbt. Bei der katalytischen Hydrierung wird rasch Wasserstoff aufgenommen, die Hydrierungsprodukte sind farblos. Diesem Befund nach sollten konjugierte Doppelbindungen am Chromophor beteiligt sein. Nachweisreaktionen mit Ninhydrin, Anilinphthalat, Fehlingscher Lösung, Dragendorf-Reagenz und Eisen(III)-chlorid verlaufen negativ, ebenso die Jodoform-Probe.

Die Lipomycine sind in alkalischen Lösungen längere Zeit stabil, während in saurem Milieu außer Umwandlung von α-Lipomycin in ß-Lipomycin auch eine weitergehende Veränderung des Lipomycin-Chromophors eintritt. Die Beständigkeit gegen Licht und Luftsauerstoff ist größer als bei typischen Polyenen.

2) α- und ß-Lipomycin-methylester

Als Säuren (IR-Bande bei 1704/cm) reagieren die Lipomycine (in Chloroform gelöst) erwartungsgemäß mit ätherischem Diazomethan. Die entstehenden Monomethylester (CO-Bande bei 1733/cm) zeigen unveränderte Indikator-Eigenschaften, sie sind jedoch weniger polar und haben im Dünnschichtchromatogramm deutlich größere R_F-Werte als die Ausgangsverbindungen. Ihre Reinigung gelingt durch Adsorption an Oxalsäure-Kieselgel. Beim α-Lipomycin-methylester treten wegen der Empfindlichkeit gegen Säuren die beim Antibiotikum genannten Schwierigkeiten auf. ß-Lipomycin-methylester wird — im Gegensatz zu ß-Lipomycin — nicht nur mit Verlusten chromatographiert, es gelingt außerdem nur unbefriedigend, die sehr lipophile Verbindung zur weiteren Reinigung aus geeigneten Lösungsmitteln unzersetzt umzufällen.

3) Summenformel und Molgewicht

Den direkt bestimmten Analysenzahlen nach enthalten die Lipomycine nur C, H, N und O, ferner C-Methyl und N-Methyl, jedoch kein Methoxyl oder Acetyl. Ausgehend von einem N-Atom pro Molekül liegt das Mol.-Gew. des α-Lipomycins um 600, das des ß-Lipomycins um 480. Für die Aufnahme eines Massenspektrums sind die Lipomycine zu wenig flüchtig. Die osmometrisch in Chloroform bestimmten Molekulargewichte (1035 – 1060 bzw. 880) sprachen zunächst für zwei N-Atome pro Molekül. Da sich für α-Lipomycin-methylester jedoch nur ein Molekulargewicht von 580 ergibt, muß man annehmen, daß die Lipomycine durch den Einfluß der veresterbaren Carboxylgruppe in Chloroform dimer vorliegen.

Für massenspektrometrische Untersuchungen besser geeignet waren die weniger polaren Methylester. ß-Lipomycin-methylester verdampft bei Temperaturen oberhalb 170° ; die Spitze bei m/e = 471

kann dem Molekülion zugeordnet werden ($C_{27}H_{37}NO_6$, durch Hochauflösung gesichert). Mit größter Häufigkeit im oberen Massenbereich (m/e >300) entsteht ein Ion bei m/e = 399 ($C_{23}H_{29}NO_5$, Hochauflösung), das durch Abspaltung von C_4H_8O (M-72)aus dem Molekül-Ion hervorgeht. Zur Interpretation des Massenspektrums vgl. Abb. 23 und Text auf S.109.

ß-Lipomycin-methylester enthält ein Methoxyl (3H-Singulett im ^{1}H-NMR-Spektrum bei δ = 3,65 ppm). Von seinem Massenspektrum ausgehend kommt man zur ß-Lipomycin-Summenformel $C_{26}H_{35}NO_6$ (Mol.-Gew. 457). die hierfür berechneten Analysezahlen stimmen mit den gefundenen jedoch erst dann befriedigend überein, wenn die Formel um 1/2 H_2O vergrößert wird. . Entweder schließen zwei Moleküle ß-Lipomycin ein Molekül Wasser ein, oder das isolierte Präparat besteht zu etwa gleichen Teilen aus zwei Komponenten, die sich um ein O-Atom oder H_2O unterscheiden und chromatographisch bislang nicht trennen lassen.

Im schwer erhältlichen Massenspektrum des α-Lipomycin-methylesters liegt das Ion mit höchster Massenzahl bei m/e = 601. Mit relativ hoher Intensität taucht eine Spitze bei m/e = 471 ($C_{27}H_{37}NO_6$, Hochauflösung) auf. Ob sich ein Bruchstück zu erkennen gibt oder in Spuren enthaltener ß-Lipomycin-methylester diese Spitze liefert, bleibt offen. Geht man von 601 als Molekül-Ion des Esters aus, so ergibt sich für diesen die Summenformel $C_{33}H_{47}NO_9$ und für α-Lipomycin, dem das Methoxyl des Esters fehlt, $C_{32}H_{45}NO_9$ (Mol.-Gew. 587). Auch hier stimmen die gefundenen Analysenzahlen mit den berechneten nur dann befriedigend überein, wenn die genannten Summenformeln um 1/2 H_2O vergrößert werden. Bis zur vollständigen Aufklärung der Struktur der Lipomycine sind die genannten Summenformeln als vorläufig anzusehen.

α – und ß–Lipomycin unterscheiden sich somit um $C_6H_{10}O_3$. Der Titration mit Alkalihydroxyd nach, enthalten die Lipomycine zwei saure Gruppen. Aus den gefundenen Äquivalent-Gewichten (302 bzw. 242) ergibt sich eine Molgewichtsdifferenz von 120, was den Wert aus den Massenspektren (130) sichert. Eine Differenz gleicher Größenordnung läßt sich auch aus den Äquivalentgewichten der später beschriebenen katalytischen Hydrierung ableiten (Tab. 3).

Tab. 3 : Summenformeln und Molekulargewichte der Lipomycine und Lipomycin-methylester

	α-Lipomycin	α-Lipomycin-methylester	ß-Lipomycin	ß-Lipomycin-methylester
Summenformel	$C_{32}H_{45}NO_9$	$C_{33}H_{47}NO_9$	$C_{26}H_{35}NO_6$	$C_{27}H_{37}NO_6$
Mol.-Gew. (aus den Massenspektren)	(587)	601	(457)	471
Mol.-Gew. (osmometrisch)	1060 1035	580	880	---
Äquival.-Gew. (Titration)	302	---	242	---
Äquival.-Gew. (Hydrierung)	119 [1]		91.5 [2] 76 [3]	

1) Pd/ Aktivkohle, Methanol

2) Pd/Bariumsulfat, Tetrahydrofuran

3) PtO_2 , Eisessig

IV. Spektroskopische Befunde

Zur weiteren Charakterisierung der Lipomycine dienten die spektroskopischen Daten (IR-, UV-, ^{1}H-NMR-, ^{13}C-NMR- und Massenspektren). Bei der Kompliziertheit der Moleküle war es nicht zu erwarten, daß sich die Spektren von vornherein in allen Einzelheiten interpretieren lassen. Erst als sich durch chemische Veränderung und chemischen Abbau Hinweise auf bestimmte Strukturelemente der Lipomycine ergaben, konnte geprüft werden, ob diese mit den spektroskopischen Daten in Einklang stehen. Deshalb gehe ich zunächst nur auf die spektroskopischen Befunde ein, die sich eindeutig erklären lassen und auf die funktionellen Gruppen der Lipomycine hinweisen. Genauere Interpretationen der Spektren finden sich in den einzelnen Kapiteln und darüber hinaus am Schluß der Arbeit, nachdem die Struktur der Lipomycine bekannt war.

Die Elektronenspektren, die in direktem Zusammenhang mit dem Chromophor stehen, werden erst in Kap. V, 3 behandelt. Die Informationen aus den Massenspektren, die über die Summenformel und das Mol.-Gew. der Lipomycine hinausgehen, sind zunächst nicht erhältlich. Das Massenspektrum des ß-Lipomycin-methylesters wird am Schluß der Arbeit interpretiert. Nachfolgend geht es um die IR-, ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren.

1) IR-Spektren

Die IR-Spektren der beiden Lipomycine (Abb. 1) sind sehr ähnlich; insbesondere haben beide die OH-Banden (3390/cm), C-H-Valenzschwingungsbanden (2980-2960/cm) und die verschiedenen Banden um 1600/cm gemeinsam. Auffallend ist das Fehlen der

Bande bei 1075 /cm im ß-Lipomycin-Spektrum. Der Molekülteil $C_6H_{10}O_3$, der nur im α-Lipomycin vorhanden ist und diese Bande hervorruft, enthält demnach keine ungesättigten funktionellen Gruppen. Im Bereich der C=C- und C=O- Valenzschwingungen (um 1600 /cm) liegen mehrere Banden. Die Absorption bei 1700/cm wird von einer Carboxylgruppe verursacht. Nach Veresterung liegt diese Bande bei 1733/cm (Estercarbonyl) ; dadurch wird eine weitere C=O-Bande bei 1686/cm sichtbar. Zwei intensive Banden, 1613 und 1560/cm, können von mit OH-Gruppen chelierten Carbonylgruppen,von olefinischen oder eventuell aromatischen Doppelbindungen stammen. Da den chemischen Befunden nach ein System konjugierter Doppelbindungen vorliegt, sollte dieses für die Banden verantwortlich sein. Bei 992/cm gibt sich dann die "out of plane" -CH-Schwingung von trans-Olefinen zu erkennen.

2) ^{1}H-NMR-Spektren der Lipomycine

Da ß-Lipomycin etwa 10 H-Atome weniger als α-Lipomycin hat, wird sein NMR-Spektrum (Abb. 2) zuerst diskutiert. Auffallend sind zwei deutlich getrennte Signalgruppen : 1) δ = 5.6–8.0 ppm für Aromat/Olefin-H und 2) δ = 0.9–3.8 ppm für Aliphat-H. Eine breite Bande um δ = 8.0 ppm verschwindet beim Schütteln mit Deuteriumoxid und stammt von 2-3 OH-Gruppen. Mit diesen geben sich 32-36 H-Atome zu erkennen, was mit der vorläufigen Summenformel (H_{35}) befriedigend übereinstimmt.

Für das Dublett δ = 5.61 ppm (J = 9.5 Hz), dessen Spitzen durch weitergehende Kopplung (1 Hz) nicht scharf sind, kommt ein Proton in Frage, das an einem olefinischen C-Atom benachbart zu einer aliphatischen Methingruppe steht. Geht man beim Integral von einem H-Atom für dieses isolierte Signal aus, so zeigt die bei tieferem Feld liegende, ziemlich komplexe Signalgruppe 7-8 weitere Olefin-H an. Bei fünf Doppelbindungen und einer an der Polyenkette hängenden Methylgruppe (verbreitertes Singulett bei δ = 1.83 ppm)

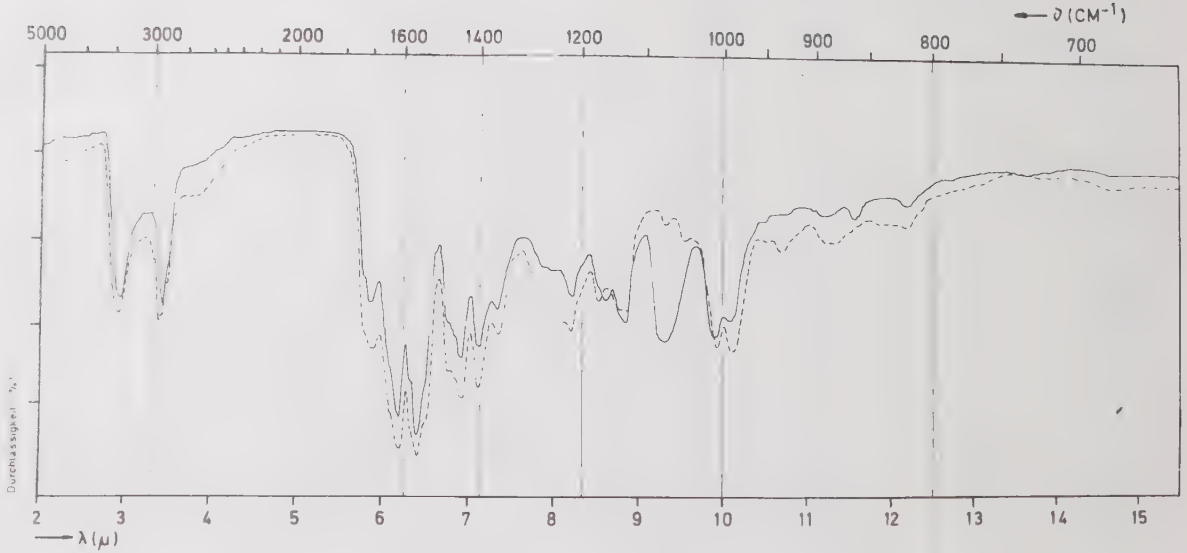


Abb. 1 : IR-Spektren (KBr) von α-Lipomycin (——) und ß-Lipomycin (- - - -)

sind maximal nur 9 H zu erwarten, zumal schon nach Aufnahme von fünf Mol-Äquivalenten Wasserstoff bei der katalytischen Hydrierung keine NMR-Signale im Olefinbereich mehr auftreten.

Im Aliphatbereich liegt neben dem 1.83-Singulett ein weiteres bei δ = 2.98 ppm, das der analytisch nachgewiesenen N-Methylgruppe zuzuordnen ist. Ein Signal in Triplettform (0.97) stammt von drei endständigen Methylgruppen. Bemerkenswert ist, daß insgesamt vier C-Methylgruppen des ß-Lipomycins bei der Kuhn-Roth-Oxidation nur die Hälfte der berechneten Menge Essigsäure liefern. Längere gesättigte Kohlenwasserstoffe enthält das Molekül nicht, denn es fehlen die dafür typischen CH_2-Signale bei δ = 1.30 ppm. Signale für Aliphat-H, deren C-Atome an Sauerstoff (Äther- oder OH-Gruppen) gebunden sind, gibt es bei δ = 3.76 1 H-Multiplett) und eventuell bei δ = 3.19 (1 H-Triplett). Neben der Carboxylgruppe geben sich so ein bis zwei weitere Sauerstoffatome zu erkennen.

Das um $C_6H_{10}O_3$ größere α-Lipomycin zeigt zusätzliche NMR-Signale nur im Aliphatbereich, jedoch keine OH-Signale mehr. Insgesamt sind die Peaks stark verbreitert, so daß das besser aufgelöste NMR-Spektrum des weniger polaren Methylesters diskutiert wird (Abb. 3). Es unterscheidet sich vom α-Lipomycinspektrum lediglich durch das 3.65-Methoxylsingulett.

Folgende Signale (durch Pfeile in Abb. 3 gekennzeichnet) sind zusätzlich zu denen des ß-Lipomycins erkennbar: 1) δ = 4.7 (1 H-Dublett: J = 10.0 Hz mit Zusatzkopplung: J = 2,0 Hz); 2) 4.07 (1 H-Multiplett); 3) 3.60 (1 H-Multiplett, vom Estermethoxyl teilweise verdeckt); 4) 3.30 (1 H-Multiplett, von Triplett bei 3.23 verdeckt); 5) 1.90-2.15 (2 H-Multiplett); 6) 1.27 (3 H-Dublett: J = 6.0 Hz). Neben aliphatischem CH_3 und CH_2 liegen vier CH-Gruppen vor, die Sauerstoffsubstituenten tragen. Diese Strukturelemente sind für Didesoxy-hexapyranosen typisch.

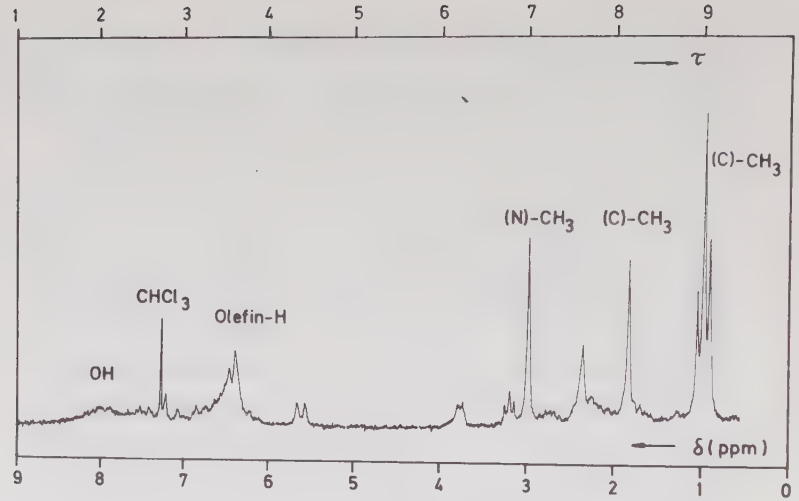


Abb. 2 : ^{1}H-NMR-Spektrum von ß-Lipomycin in $CDCl_3$

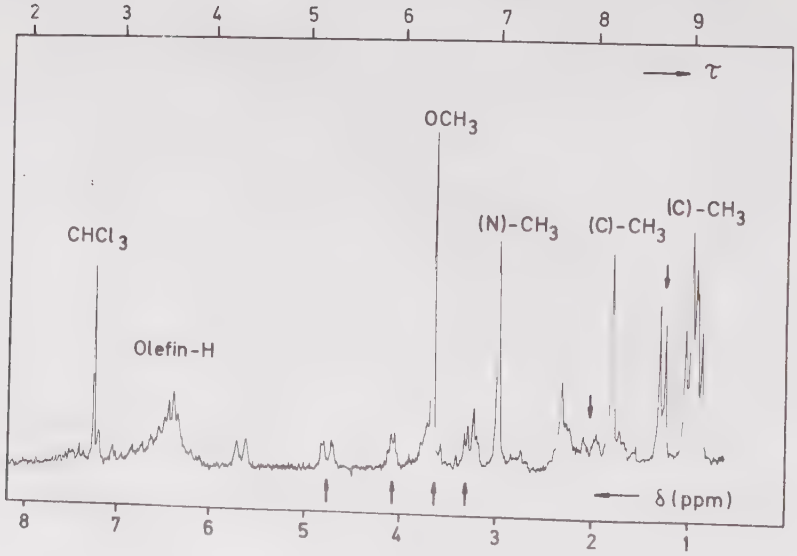


Abb. 3 : ^{1}H-NMR-Spektrum von α-Lipomycin-methylester in $CDCl_3$

3) PFT-^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins

A. Allgemeines zur ^{13}C-NMR-Spektroskopie [9,10]

Erst in den letzten Jahren ist die ^{13}C-NMR-Spektroskopie zu einem routinemäßig anwendbaren Verfahren in der organischen Chemie geworden. Im Gegensatz zur ^{1}H-NMR-Spektroskopie wird hier der Atomkern des Kohlenstoffisotops ^{13}C in seinem Resonanzverhalten gemessen. Dies bringt entscheidende Vorteile mit sich, da in einer organischen Verbindung in erster Linie das Kohlenstoffgerüst interessiert. Zudem kann man nun auch Informationen von Verbindungen erhalten, die zu wenige oder zu wenig nicht äquivalente H-Atome besitzen. Da erst seit kurzer Zeit leistungsfähige Meßgeräte verfügbar sind, liegen bisher nicht sehr viele Vergleichsspektren vor. Der Informationsgehalt von ^{13}C-NMR-Spektren ist dadurch noch eingeschränkt. Ein Nachteil der Methode ist, daß für eine Messung relativ viel Substanz benötigt wird (200 – 300 mg bei einem Naturstoff von der Kompliziertheit des ß-Lipomycins mit 26 C-Atomen).

Daß die ^{13}C-NMR-Spektroskopie erst heute verfügbar ist, liegt an einigen grundsätzlichen Unterschieden zur ^{1}H-NMR-Spektroskopie und den damit verbundenen instrumentellen Schwierigkeiten, die zu überwinden waren.

Das Kohlenstoffisotop ^{13}C kommt im natürlichen Kohlenstoff nur zu 1,1% vor. Zudem ist die Relaxationszeit seines Kerns länger als die des Protons und sein gyromagnetisches Verhältnis geringer, was dazu führt, daß er um den Faktor 6000 schwächere Resonanzsignale hervorruft. Mit herkömmlichen NMR-Geräten kann man darum kein brauchbares ^{13}C-NMR-Spektrum aufnehmen. Lediglich mit Hilfe von CAT-Einrichtungen bekommt man bei größtmöglicher Menge einer flüssigen Substanz registrierbare Signale.

Für komplizierte Naturstoffe war auch dieses Meßverfahren nicht geeignet.

Man wendet darum heute eine Aufnahmetechnik an, die als Puls-Fourier-Transform-^{13}C-NMR-Spektroskopie bezeichnet wird. Sogenannte Impuls-Interferogramme enthalten die gesammte Information eines NMR-Spektrums und werden durch Fourier-Transformation in ein Spektrum der Larmor-Frequenzen, also in das NMR-Spektrum selbst, überführt. Verschiedene instrumentelle Voraussetzungen ermöglichen es, mehrere tausend Impulse in verkürzter Folge aufzunehmen und zu akkumulieren. Dadurch wird die Empfindlichkeit der Methode entscheidend gesteigert.

Eine Schwierigkeit liegt in der Kopplung der ^{13}C-Kerne mit benachbarten Kernen ungradzahligen Spins. Wegen des geringen Gehalts an ^{13}C ist es nur wenig wahrscheinlich, daß ^{13}C-Kerne benachbart zu einanderstehen. Kopplungen der ^{13}C-Kerne untereinander beobachtet man also nicht. Anders verhält es sich mit ^{13}C-^{1}H-Wechselwirkungen. Hier findet man Signalaufspaltungen mit Kopplungskonstanten über 100 Hz und erhält durch Signalüberlappungen unübersichtliche, nur schwer auswertbare Spektren. Darum wendet man eine Breitbandentkopplung nach Art üblicher Doppelresonanz an, indem man die Probe mit einer Radiofrequenz bestrahlt, deren Frequenzband den gesammten Bereich der Larmorfrequenzen der Protonen umschließt. Jedes nicht äquivalente C-Atom gibt dann ein einzelnes Signal. Die Informationen durch ^{13}C-^{1}H-Kopplung können unter anderen Bedingungen wieder zugänglich gemacht werden. Durch "Off-Resonance"-Teilentkopplung (Einstrahlen einer Zweitfrequenz nicht innerhalb, sondern einige 100 Hz außerhalb des Larmorfrequenzbereichs der Protonen) erscheinen nun primäre, sekundäre, tertiäre und quartäre Protonen

als Quadrupletts, Tripletts, Dubletts und Singuletts, wobei die Kopplungskonstanten nur 10 bis 50 Hz betragen.

B. Erläuterungen zum PFT-^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins

Abb. 4 zeigt das PFT-^{13}C-NMR-Spektrum (22.63 MHz) des ß-Lipomycins in Chloroform. Die Probe (2.5 ml) war 0.18 molar, d.h. es wird mit insgesamt 220-240 mg ß-Lipomycin 4-6 mal so viel Substanz benötigt, wie für das 100 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 3). Es wurden 1400 Impulse akkumuliert, d.h. bei einem Impulsintervall von 0.4 Sek. dauert die Aufnahme des Spektrums etwa zwei Stdn. Die angegebenen δ-Werte beziehen sich auf Tetramethylsilan als internem Standard. Alle ^{13}C-Signale liegen bei niedrigerem Feld als TMS und werden in Anlehnung an die ^{1}H-Signale mit positivem Vorzeichen angegeben.

Im PFT-^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins findet man 31 Signalspitzen, von denen eine (δ = 28.1 ppm) hartnäckig in der Substanz festgehaltenem Cyclohexan zuzuordnen ist (identifiziert durch Vergleich der ^{13}C-NMR-Spektren zweier ß-Lipomycin-Präparate, die unterschiedliche Cyclohexanmengen enthielten). Vier weitere niedrige Spitzen (δ = 18.3, 27.2, 139.9 und 172.6 ppm) liegen sehr dicht an einem höherem Hauptsignal. Ordnet man diese Doppelspitzen jeweils nur einem C-Atom zu, so bleiben 26 Spitzen übrig, was mit den von der Summenformel geforderten 26 C-Atomen im Einklang steht. Entsprechend wurden die Signale durchnummeriert (1-26) und die Doppelsignale zur Unterscheidung mit 3a/b, 6a/b, 19a/b und 24a/b bezeichnet. In Abb. 4 ist bei einzelnen Signalen durch die Buchstaben S, D und T ferner angegeben, welches Kopplungsschema für dieses Signal bei der

Off-Resonance-Teilentkopplung mit Sicherheit erkannt wurde : d.h. für diese C-Atome läßt sich die Zahl der anhängenden Wasserstoffatome angeben. Bei C-Atomen, deren Signale eng zusammenliegen, sind Angaben nur möglich, wenn echte Singuletts vorliegen (keine Veränderung bei der Teilentkopplung).

Das Auftreten der Doppelspitzen bei einigen Signalen läßt sich endgültig nicht erklären. Das eingesetzte ß-Lipomycin war chromatographisch einheitlich und dem ^{1}H-NMR-Spektrum nach bis auf Cyclohexan nicht mit anderen Substanzen verunreinigt. Da zwei der Signale im Aliphatbereich, eines im Olefinbereich und eins im Carbonylbereich liegen, ergeben sich keine Hinweise auf mögliche Verunreinigungen, die sich aus der Vorbehandlung der Substanz erklären ließen. Möglich wäre, daß in der konzentrierten Meßlösung durch die Bildung von Lipomycin-Assoziaten — wie sie bei der osmometrischen Molgewichtsbestimmung nachgewiesen wurden — einzelne C-Atome nicht mehr äquivalent sind und es zur Verbreiterung bzw. Aufspaltung von Signalen kommt. Bei einer gleich konzentrierten Lösung beobachtet man auch im ^{1}H-NMR-Spektrum verbreiterte und unstrukturierte Signale. In der Literatur sind Signalaufspaltungen in Spektren von Polymeren (Polyvinylchlorid [11], Poly-1,4-isopropylen [12]) beschrieben worden.

Weniger wahrscheinlich ist es, daß cis-trans Isomere oder Stereoisomere (Diastereomere) nebeneinander vorliegen. Doppelspitzen sollten dann bei weit mehr als nur vier C-Atomen auftreten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der hohe Substanzbedarf bei der ^{13}C-NMR-Spektroskopie sich im Falle des ß-Lipomycins besonders nachteilig auswirkt. Zum einen war es recht aufwendig, größere Substanzmengen so gut wie möglich zu reinigen,

zum anderen verfälscht die hohe Konzentration der Lösung offenbar das Spektrum.

Ein so umfangreiches Vergleichsmaterial für die unterschiedliche chemische Verschiebung von C-Atomen wie bei der ^{1}H-NMR-Spektroskopie für H-Atome existiert bei der ^{13}C-NMR-Spektroskopie bisher nicht. Man ist so auf allgemeiner gehaltene Angaben und auf Vergleiche mit nicht immer ganz passenden Modellverbindungen angewiesen [10, 9]. Ohne Kenntnis genauer Strukturdetails lassen sich dem ß-Lipomycin-Spektrum lediglich folgende eindeutige Informationen entnehmen.

Die Signale 1-8 im Bereich δ = 10-40 ppm stammen von aliphatischen Kohlenstoffatomen. Auch die N-CH_3 und die olefinische CH_3-Gruppe gehören dazu. Keins der Signale bleibt nach Teilentkopplung ein Singulett. Ein quartäres C-Atom wird in dem Bereich also nicht angezeigt. Die Signale 9, 10 und 11 liegen zwischen Aliphaten- und Olefinbereich. Sie können von aliphatischen C-Atomen, benachbart zu elektronenziehenden Gruppen (z. B. Carbonyl und Hydroxylgruppen) stammen. 11 (D, δ = 80.7 ppm) ist möglicherweise das Sauerstoff-tragende C-Atom eines sekundären Alkohols. Der Olefinbereich umfaßt 11 Signale (δ = 99.7 - 144.2 ppm), von denen nur 12 und 17 zu protonenfreien C-Atomen gehören (Singulett nach Teilentkopplung). Eines von beiden, wahrscheinlich 17, ist mit der olefinischen CH_3-Gruppe verbunden. Alle übrigen Signale werden von sehr ähnlichen olefinischen CH-Gruppen verursacht. Insgesamt geben sich so fünf annähernd gleichwertige Doppelbindungen zu erkennen. Um 12 zu erklären, muß man eine weitere Doppelbindung annehmen, allerdings fehlt dazu das zweite C-Atom. Die Signale 23, 24, 25 und 26 gehören ihrer Lage nach zu Carbonyl-C-Atomen. 26 paßt zu einem α,ß-ungesättigtem Keton. 25 könnte von der nachgewiesenen Carboxylgruppe stammen.

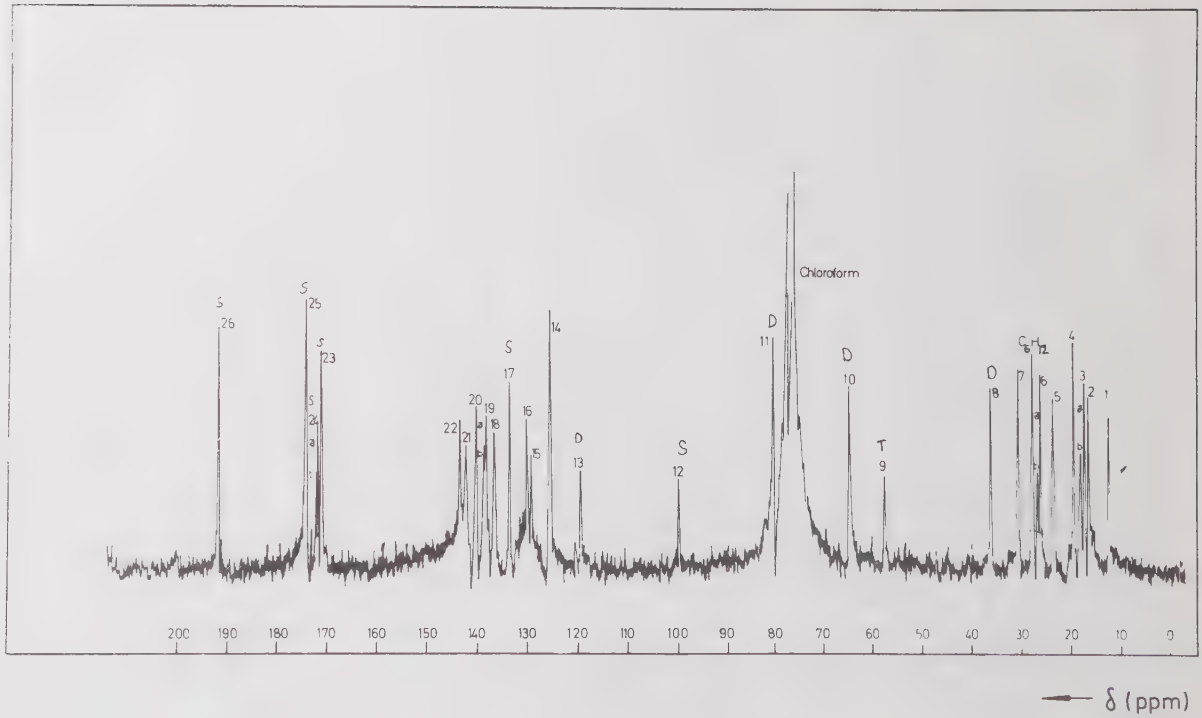


Abb. 4 : PFT-^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins in $CHCl_3$

Das ^{13}C-NMR-Spektrum kann allein nur wenig zur Strukturermittlung des ß-Lipomycin beitragen. Erst nachdem die Struktur bekannt war, konnte diese mit den ^{13}C-Daten verglichen werden.

V. Ermittlung der Struktur

1) Allgemeines

Nachdem es gelungen war, die Lipomycine zu isolieren und zu reinigen, und nachdem durch die analytischen und spektroskopischen Daten eine Identität mit bekannten Antibiotika ausgeschlossen werden konnte, wurde die Strukturaufklärung in Angriff genommen. Dabei erschien es sinnvoll, mit zwei Teilproblemen zu beginnen :

1) α-Lipomycin geht unter Einwirkung von Säuren in ß-Lipomycin über. Dabei wird ein zuckerähnlicher Molekülteil abgespalten, der zu isolieren und aufzuklären war.

2) Bei farbigen Verbindungen ist es für die Ermittlung des C-Atomgerüsts günstig, zunächst den Chromophor des Moleküls durch Vergleich mit bekannten chromophoren Systemen zu identifizieren. Da die Lipomycine konjugierte Doppelbindungen enthalten, waren wichtige Ergebnisse aus den Elektronenspektren und bei der katalytischen Hydrierung zu erwarten.

Erst in einer zweiten Phase meiner Arbeit habe ich damit begonnen, das vollständige Kohlenstoffskelett der Lipomycine durch geeignete Abbaureaktionen aufzuklären. Die Untersuchungen führten am Ende zur Strukturformel (37b) bzw. (37 a)(S.107) für α – bzw.

ß-Lipomycin.

2) Der Zucker des α-Lipomycins

A. Darstellung und allgemeiner Nachweis der Methylglykoside

Erste Hinweise auf einen leicht abspaltbaren Molekülteil im α-Lipomycin ergaben sich aus Versuchen, die Lipomycine oder deren Hydrierungsprodukte in leichter chromatographierbare Derivate umzuwandeln. In saurem Milieu geht α-Lipomycin, wie später bewiesen wurde, in ß-Lipomycin über. Dabei läßt sich im Chromatogramm durch Ansprühen mit methanolischer Schwefelsäure (Schwarzfärbung) eine farblose Substanz nachweisen, während die ß-Lipomycinderivate am Start verbleiben. Da die Substanz auch an Floureszenz-Kieselgel im UV-Licht nicht sichtbar wird, kann sie keine ungesättigten Gruppen enthalten. Die Säureempfindlichkeit des α-Lipomycins und die C_6-Differenz der Summenformel zu ß-Lipomycin ließen vermuten, daß α-Lipomycin eine glykosidisch gebundene Hexose enthält. Dem Differenzbetrag (130) der Molgewichte nach sollte bei der Hydrolyse ein Zucker $C_6H_{12}O_4$, also ein Didesoxyzucker, bei der Methanolyse dessen Methylglykosid $C_7H_{14}O_4$ entstehen.

Da α-Lipomycin in Wasser nicht genügend löslich ist, kam für die gezielte Abspaltung des Zuckers nur eine Methanolyse in Frage. Umsetzung mit 0,1 n methanolischer Schwefelsäure bei Zimmertemperatur lieferte zwei Zuckerkomponenten (anomere Methylglykoside), deren Mengenverhältnis von den Reaktionsbedingungen abhängt. Nachfolgende Hydrolyse mit 0,02 n Schwefelsäure führte zu einem einheitlichen Produkt mit kleinerem R_F-Wert. Alle drei Verbindungen lassen sich im Chromatogramm mit Reagenzien für 2-Desoxyzucker charakteristisch anfärben.

Das Aglykon (vorwiegend ß-Lipomycin-methylester und gelbe Verbindungen) fiel beim Neutralisieren der Methanolyselösung mit wäßr. Bariumhydroxid zusammen mit dem Bariumsulfat aus und konnte nach Filtrieren von diesem mit Methanol eluiert und anschließend chromatographisch gereinigt werden.

B. Gaschromatographische Trennung und Massenspektren der TMS-Äther der Methylglykoside

Bei der Charakterisierung von Polyolen, insbesondere Mono- und Disacchariden, hat es sich bewährt, die leichter flüchtigen Trimethylsilyläther (TMS-Äther) herzustellen, diese gaschromatographisch zu trennen und anschließend im Massenspektrometer zu untersuchen [13].
Das Fragmentierungsmuster liefert Hinweise auf das Molekulargewicht, sowie die Zahl und Stellung der TMS-Äthergruppen. Die Retentionszeit erlaubt es, Diastereomere zu unterscheiden und — sofern Vergleichssubstanzen verfügbar sind — die Identität einzelner Verbindungen zu beweisen.

Umsetzung von 1 bis 2 mg der Methylglykoside aus α-Lipomycin mit Trimethylchlorsilan/Hexamethyldisilazan in Pyridin gab die Trimethylsilyläther [14]. Das Gemisch wurde im Gaschromatographen an Silicon-SE-30 aufgetrennt. Die Massenspektren der einzelnen Komponenten (GC-MS-Kombination) waren identisch.
Abb. 5 zeigt das Massenspektrum der Hauptkomponente.

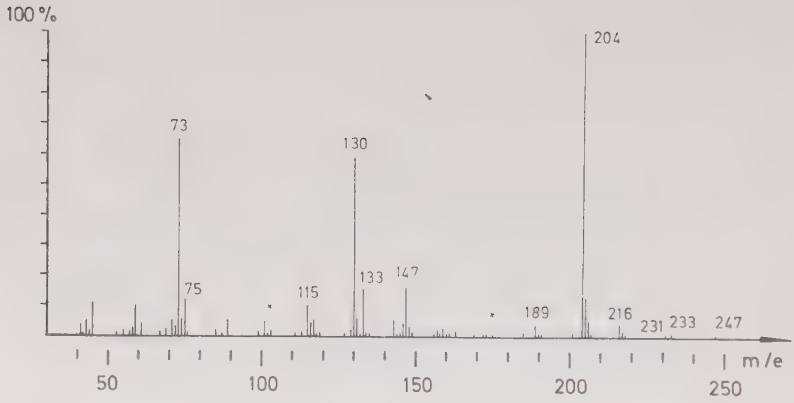


Abb. 5 : Massenspektrum des TMS-Äthers des Methylglykosids (Hauptkomponente) aus α-Lipomycin

Verschiedene im Spektrum zum Teil mit großer Häufigkeit auftretende Ionen sind allgemein typisch für Trimethylsilyläther [13]:

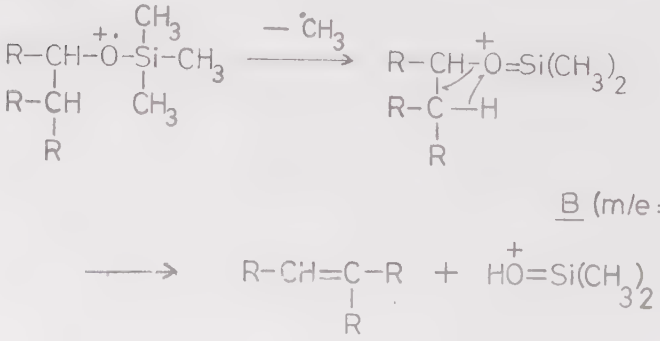
A : m/e = 73 (64%) $(CH_3)_3Si^+$

B : m/e = 75 (13%) $HO^+ = Si(CH_3)_2$

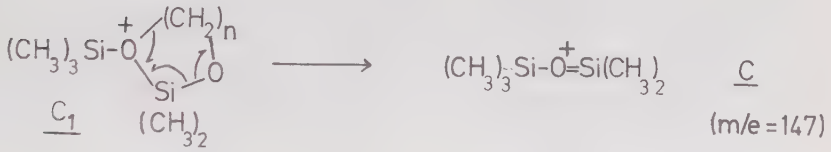
C : m/e = 147 (17%) $(CH_3)_2Si = {}^+O\text{-}Si(CH_3)_3$

D : m/e = 204 (100%) $(CH_3)_3SiOCH{=}CHOSi(CH_3)_3^+$

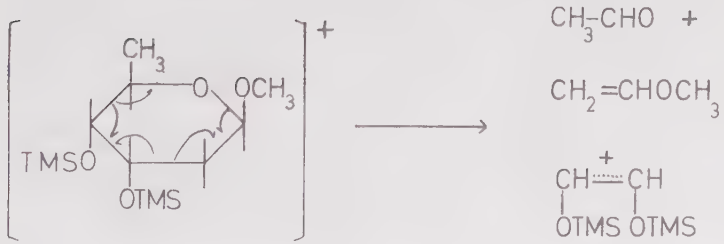
A dürfte durch radikalischen O-Si-Bindungsbruch entstehen ;
B dagegen im Zuge einer α-Spaltung nach vorheriger Abspaltung eines CH_3-Radikals.



Für C wird nach Diekmann u. a.[15] und Richter u. a.[16] eine Entstehung über das cyclische Zwischenprodukt C_1 vorgeschlagen, das nach Abspaltung eines CH_3-Radikals vom Si unter Ringschluß mit benachbartem Sauerstoff entsteht. Zweimaliger Bindungsbruch führt von C_1 zu C . n in C_1 kann bei offenkettigen Polyolen maximal 8 sein. Für Hexopyranosen ist die Reaktion nur denkbar, wenn die beiden Äthergruppen benachbart sind. Dies gilt auch für das Entstehen von D , das sich im Zuge einer Spaltung des Pyranrings bildet. Es geht anschließend unter Verlust eines CH_3-Radikals in das Ion bei m/e = 189 über, wie der metastabile Peak m^* = 175 beweist.



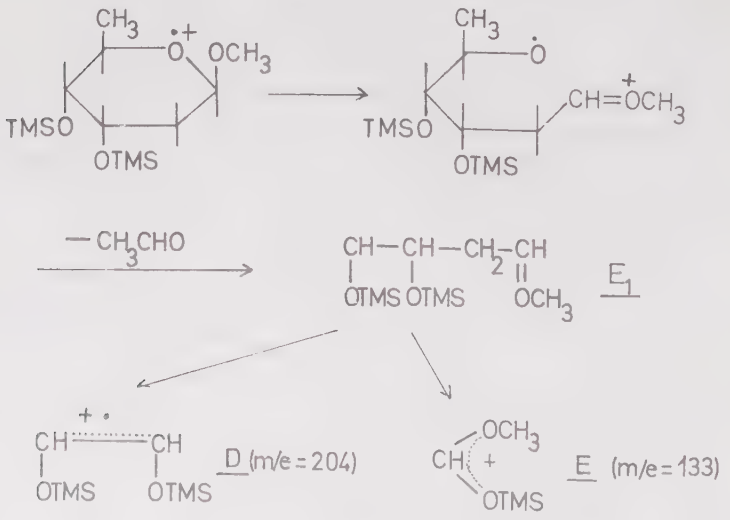
C_1 C (m/e = 147)



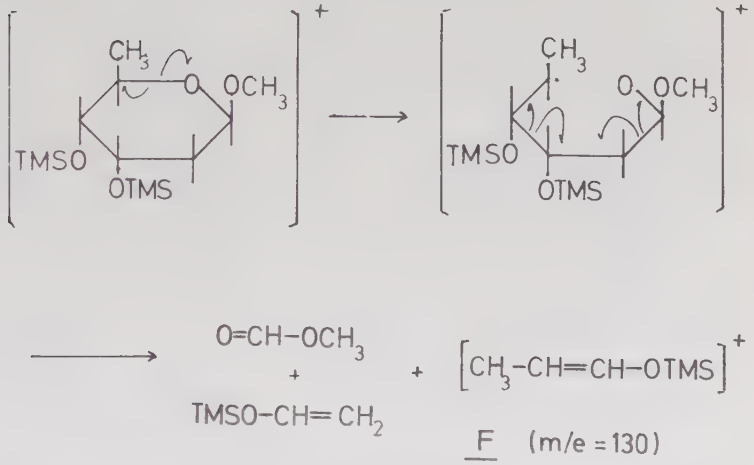
D (m/e = 204)

Das Spektrum (Abb. 5) zeigt kein Molekül-Ion. Die Molmasse (306) wird durch die Ionen bei m/e = 233 und 216 (M^+-Trimethylsilylradikal und M^+-Trimethylsilanol) bewiesen. Für die Spitzen bei m/e = 231 und 247 werden in der Literatur keine Erklärungen angegeben. Insgesamt paßt das Mol. -Gew. auf das Methylglykosid $C_7H_{14}O_4$ einer Didesoxyhexose, die mit zwei Trimethylsilylgruppen veräthert ist.

Das Zustandekommen der noch verbleibenden Spitzen kann mit Hilfe des Fragmentierungsschemas für permethylierte Hexopyranosen erklärt werden[17]. E (m/e = 133 ; 16%) entsteht aus dem Zwischenprodukt E_1, das sich durch Bindungsbruch zwischen Ringsauerstoffatom und C-1 bildet. Ebenfalls die Bildung des schon erwähnten Bruchstücks D läßt sich so formulieren . Eigentlich sollte E nur entstehen, wenn eine TMS-Äthergruppe an C-2 steht. Möglich ist allerdings auch eine Umlagerung der TMS-Äthergruppe von C-3 nach C-1 .



Mit einer Ringöffnung zwischen Ringsauerstoff und C-5 wird die Bildung von F (m/e = 130 ; 59%) eingeleitet :

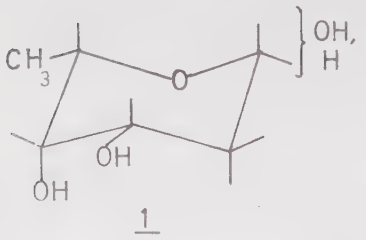


Abspaltung eines CH_3-Radikals aus F gibt das Ion bei m/e = 115 (m^* = 102) . F beweist eindeutig, daß an C-4 eine OTMS-Gruppe steht und an C-5 eine Methylgruppe. Damit ist die Stellung des zweiten Hydroxyls im Zucker mit C-3 festgelegt, da nach C und D beide Hydroxyle benachbart sein müssen.

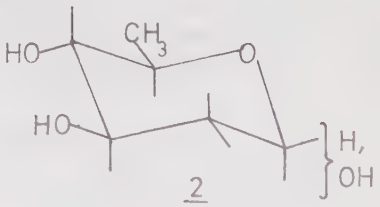
Somit folgt aus dem Massenspektrum, das mit kleinen Substanzmengen zu erhalten war, daß der α-Lipomycinzucker eine 2, 6-Didesoxy-hexapyranose ist.

C. Vergleich des α-Lipomycinzuckers mit anderen 2,6-Didesoxyhexosen durch Dünnschicht- und Gaschromatographie

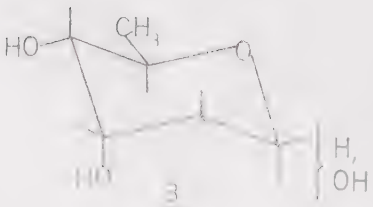
Im folgenden mußte zwischen den vier möglichen diastereomeren 2,6-Didesoxy-hexosen (ausgehend von der stabilen Pyranoseform) entschieden werden und die Zuordnung zur D- oder L-Reihe erfolgen. Aus Glykosid-Antibiotika hat man 2,6-Didesoxy-hexopyranosen mit lyxo- (1, 2-Desoxy-L-fucose) und arabino-Konfiguration (2, 2-Desoxy-D-rhamnose) isoliert. Typische Vertreter dieser Antibiotika-Gruppe sind u.a. die Anthracycline, Chromomycine, Olivmycine, Venturicidine und Clorothricin. D-Digitoxose (3, ribo-Konfiguration) kennt man aus Digitalis-Glykosiden [18]. Ein Antibiotika-Zucker mit ribo-Konfiguration ist die L-Mycarose der Macrolid-Antibiotika, sie trägt neben der axialen OH-Gruppe an C-3 in 3 jedoch eine äquatoriale Methylgruppe. D-Boivinose (4, xylo-Konfiguration) wurde aus Glykosiden von Strophanthus boivini isoliert [19], ist jedoch als Bestandteil von Antibiotika bisher nicht gefunden worden.



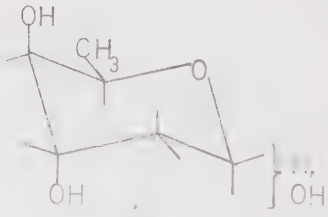
1



2



3



4

2 und 4 konnten durch die Elektrophorese ausgeschlossen werden. Der α-Lipomycinzucker wandert im Boratpuffer zur Anode (Komplexbildung und Veresterung mit Borsäure). Die benachbarten OH-Gruppen (an C-3 und C-4) müssen daher cis-ständig sein, was nur für Digitoxose und 2-Desoxy-fucose zutrifft. Die weitere Entscheidung war durch Vergleich der R_F-Werte im Dünnschichtchromatogramm und den Retentionszeiten (TMS-Äther im Gaschromatogramm) möglich. Als Vergleichssubstanz standen D-Digitoxose und 2-Desoxy-L-fucose (aus ß-Rhodomycin $V^{20)}$) zur Verfügung. Dabei verhielten D-Digitoxose und der α-Lipomycinzucker sich sehr ähnlich und waren von 2-Desoxy-L-fucose deutlich zu unterscheiden (Tab. 4). Der α-Lipomycinzucker ist also D- oder L-Digitoxose. Bevor dies entschieden und die relative Konfiguration mit Hilfe des NMR-Spektrums bewiesen wird, soll noch auf das Gaschromatogramm des TMS-Äther-Gemisches eingegangen werden, das einige Besonderheiten zeigt.

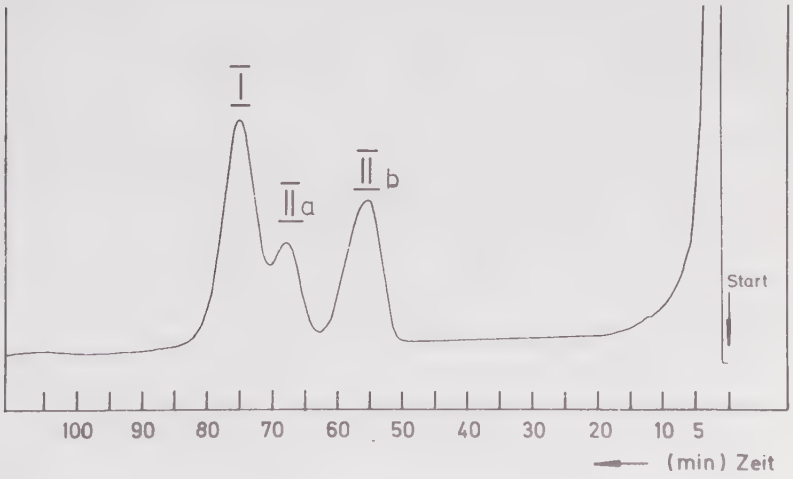


Abb. 6 : Gaschromatogramm der TMS-Äther der Methylglykoside aus α-Lipomycin (Säule : 4% Silicon SE-30 ; Säulenofen: 85°)

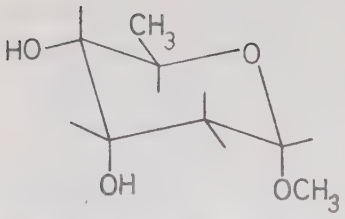
Tab. 4 : R_F-Werte im Dünnschichtchromatogramm und Retentionszeiten der Silyläther im Gaschromatogramm

	Chloroform/ Aceton (4 : 6)	Äthylacetat/ Methanol (8 : 2)	n-Butanol/ Toluol/Wasser (9 : 1 : 1)	Retentionszeiten (4% SE-30; 90°)
α-Lipomycinzucker (= D-Digitoxose)	0. 18	0. 35	0. 51	
Methylglykosid I (= ß-Methyl-D-digitoxosid)	0. 33	0. 46	0. 78	61. 5 Min.
Methylglykosid II (= α-Methyl-D-digitoxosid)	0. 25	0. 41	0. 76	55.8 und 45. 3 Min. (aus D-Digitoxose). 56 und 48 Min. (aus α-Lipomycin)
2-Desoxy-L-fucose	0. 09	0. 26	0. 39	
Methylglykosid der 2-Desoxy-L-fucose	0. 23	0. 39	0. 71	76, 59 und 55 (Hauptprod.) Min.
2-Desoxyribose	0. 12	0. 22	0. 29	

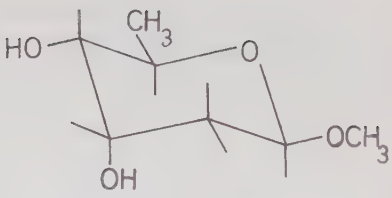
Wie das Gaschromatogramm (Abb. 6) zeigt , bekommt man nach Methanolyse von α-Lipomycin und anschließender Trimethylsilylierung ein Silyläthergemisch von drei Komponenten. Ihre Anteile waren bei mehreren Proben unterschiedlich, was mit der Reaktionszeit bei der Methanolyse zusammenhängt. Die Peak I entsprechende Verbindung war in allen Fällen das Hauptprodukt, während Peak IIa manchmal gar nicht auftrat und IIb sehr klein war. Als es gelang, die Lipomycin-Methylglykoside an Kieselgel zu trennen, konnte die Hauptkomponente (Methylglykosid I) mit Hilfe des ^{1}H-NMR-Spektrums als ß-Methyl-digitoxosid zugeordnet werden. Dieses gibt als TMS-Äther im Gaschromatogramm einen Peak, dessen

Retentionszeit mit dem von Peak I übereinstimmt, der in einem Reaktionsgemisch, ausgehend von authentischer D-Digitoxose, nachgewiesen wurde. Methylglykosid II ist dann das α-Methyl-digitoxosid ; überraschenderweise gibt es nach Trimethylsilylierung zwei TMS-Äther-Peaks im Gaschromatogramm (IIa/b in Abb. 6). Wie Tab. 4 zeigt, weichen hier die Retentionszeiten von denen der Silyläther aus authentischen α-Methyl-D-digitoxosid geringfügig ab. Peak IIb ist zudem unsymmetrisch und enthält somit keine völlig einheitliche Substanz. Eine plausible Erklärung hierfür bietet sich nicht an. Zu diskutieren ist, daß sich die Zusammensetzung des Methylglykosidgemisches mit der Reaktionszeit der Methanolyse ändert, ferner das α-Anomere im Gegensatz zum ß-Anomeren vermutlich konformere Trimethylsilyläther bildet.

α-Methyl-digitoxosid hat eine energetisch günstigere Konformation als sein ß-Anomeres. Dafür spricht der qualitative experimentelle Befund, daß der Anteil des α-Anomeren mit der Dauer der Methanolyse zunimmt. Wie sich später zeigte, ist der α-Lipomycinzucker ß-glykosidisch an sein Aglykon gebunden und zunächst überwiegend das ß-Methylglykosid, das sich im sauren Milieu langsam in das stabilere α-Anomere umwandelt. Die beiden Vergleichszucker D-Digitoxose und 2-Desoxy-L-fucose, die man unter den gleichen Bedingungen in die Methylglykoside und anschließend in die Trimethylsilyläther überführte, stützen diese Vermutung. Die Gaschromatogramme zeigen, daß die ß-Methylglykoside (Peaks mit längster Retentionszeit [21]) nur in geringer Menge entstehen, während die Silyläther der α-Methylglykoside (Peaks mittlerer und kürzester Retentionszeit) den Hauptanteil ausmachen. Hier erfolgt die Gleichgewichtseinstellung anscheinend schneller, was plausibel ist, da bei den Vergleichssubstanzen vom Anomerengemisch des Zuckers und nicht von einer optisch eindeutigen Verbindung wie beim α-Lipomycin ausgegangen wird.



α-Methyl-D-digitoxosid (6)

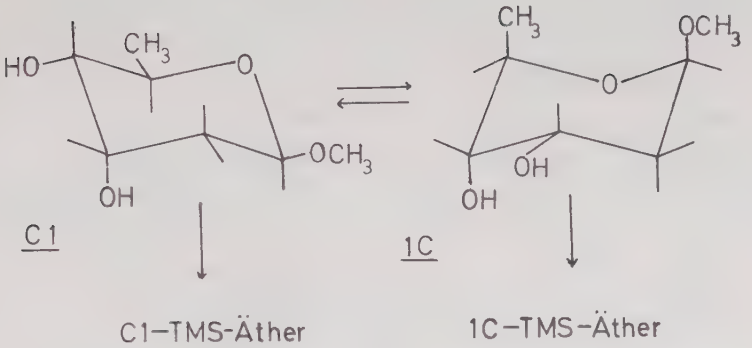


ß-Methyl-D-digitoxosid (5)

Daß in saurer methanolischer Lösung die α-Methylglykoside von D-Digitoxose und 2-Desoxy-L-fucose dem ß-Anomeren gegenüber energetisch bevorzugt sind, ist eine Folge des "anomeren Effekts" [22,23,24]. Danach sollen die freien Elektronenpaare benachbarter Sauerstoffatome sich wegen abstoßender Dipolwechselwirkungen möglichst weit von einander entfernt anordnen. Dies ist im α-Methyl-D-digitoxosid (6) besser verwirklicht als im ß-Methyl-D-digitoxosid (5). Dazu kommt in 6 noch die Möglichkeit, daß sich zwischen Methoxylsauerstoff an C-1 und der axialen OH-Gruppe an C-3 eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden kann.

Daß ß-Methyl-D-digitoxosid nur einen Silyläther gibt, beweist, daß es nur in einer Konformation vorliegt. Das Massenspektrum schließt die mögliche Furanose-Form aus (die Ionen D und C beweisen zwei benachbarte Silyläthergruppen, die bei der Furanose-Form nicht vorhanden sind); so ist nur zwischen den beiden Pyranose-Konformeren zu entscheiden :

ß-Methyl-D-digitoxosid :

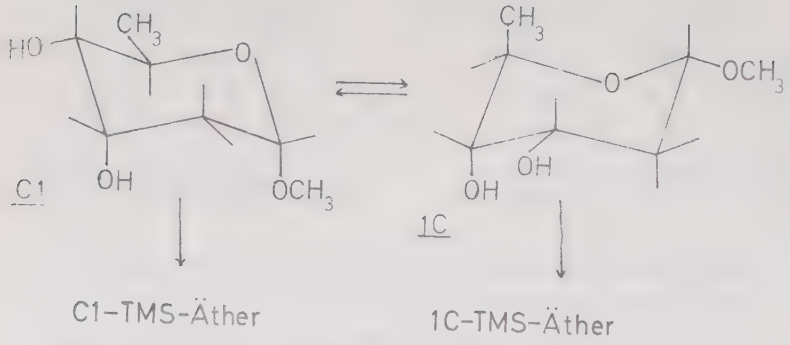


Es ist möglich, daß allein die 1 C-Form den Silyläther bildet, da sie durch den anomeren Effekt begünstigt wird.
Das relativ polare Lösungsmittel (Methanol) begünstigt allerdings C 1 . Die OH-Gruppen und die Methoxylgruppe erscheinen durch ihre Solvathülle weit voluminöser als es in unpolaren aprotischen Lösungsmitteln der Fall wäre und werden dadurch in die äquatoriale Lage gedrängt. Berechnungen von Wechselwirkunsenergien, wie sie für die Konformationen von D-Aldopyranosen in H_2O vorliegen und anhand derer vorausgesagt werden kann welche Konformation überwiegend vorliegt, existieren für 2. 6-Didesoxymethylhexapyranoside nicht. Der Einfluß anderer Lösungsmittel braucht nicht diskutiert werden. Die Silylierung in Pyridin ist verhältnismäßig schnell beendet, und danach ist wohl keine Änderung in der Zusammensetzung des Konformerengemischs mehr zu erwarten. Die relativ sperrigen TMS-Gruppen verhindern das rasche Umklappen der Ringe.

α-Methyl-D-digitoxosid bildet zwei verschiedene TMS-Äther zu ungefähr gleich großen Anteilen und dies obwohl von beiden Pyranosekonformeren C 1 deutlich bevorzugt ist (Anomerer Effekt , intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen OH an C-3 und OCH_3-

Gruppe an C-1).

α-Methyl-D-digitoxosid :



Zwar läßt sich zugunsten von 1C ein durch Solvatation verstärkter sterischer Effekt anführen ; anscheinend ist aber bei der Bildung des 1C-Silyläthers noch ein anderer Aspekt zu berücksichtigen. Während die OH-Gruppen in 1C ungehindert in Trimethylsilyl-gruppen überführt werden können, ist für die OH-Gruppe an C-3 in C1 dies erst nach Lösen der intramolekularen Wasserstoffbrücken-bindung möglich ; d.h. 1C reagiert vermutlich schneller, wird dem Anomeren-Gleichgewicht entzogen und bildet sich aus C1 nach. So kann — sofern die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte im günstigen Verhältnis zueinander stehen — relativ viel 1C-TMS-Äther (der sich nicht mehr verändert) entstehen, ob-wohl das Ausgangsprodukt nur zu einem geringen Anteil vorhanden war.

Auch dies kann nur ein Vorschlag zur Interpretation der Beob-achtungen sein. Untersuchungen über TMS-Äther von Pyranosen sind nur unvollständig [22]. Insbesondere den stereochemischen Effekten

könnte man im Rahmen einer anderen Arbeit nachgehen. In dem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, welche weiteren Nebenprodukte bei der Trimethylsilylierung entstehen. In mehreren Proben fand ich deutliche Peaks im Gaschromatogramm gleich hinter dem Lösungsmittelpeak. Vielleicht handelt es sich dabei um glykosidische Anhydride (nachgewiesen bei Hexapyranosen und -furanosen [22]), die eine OTMS-Gruppe weniger und damit kürzere Retentionszeit haben.

D. Konformationsananlyse durch ^{1}H-NMR-Spektrum

Die Isolierung des α-Lipomycin-Zuckers und seiner Methylglykoside gelang durch Chromatographie an neutralem Kieselgel im System Chloroform/Aceton (1 : 1). Aus 34 mg Methylglykosidgemisch (durch Methanolyse von 200 mg α-Lipomycin) erhielt man 19 mg Methylglykosid I und 1.2 mg Methylglykosid II. Den Zucker selbst bekam man durch Hydrolyse des Methylglykosidgemisches in 80%iger Ausbeute.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 7) von Methylglykosid I beweist, daß es sich um ß-Methyl-digitoxosid handelt. Zu diesem Schluß kommt man nach Zuordnung der einzelnen Signale und durch Doppelresonanzversuche :

Das Singulett bei δ = 3.47 ppm stammt von der Methoxylgruppe (3 H), ein breites Signal bei δ = 2.36 ppm von zwei OH-Gruppen. Die Methylgruppe an C-5 (δ = 1.32 ppm, D, J = 6.2 Hz) koppelt mit 5-H (δ = 3.75 ppm). Außerdem koppelt 5-H mit 4-H (δ = 3.31 ppm) und dieses mit 3-H (δ = 4.12 ppm). Die geminalen Protonen $2-H_e$ und $2-H_a$ (δ = 2.12 und 1.70 ppm) geben jeweils acht Linien,

denn die geminale AB Kopplung wird noch von der Wechselwirkung mit 3-H und 1-H (δ = 4,72 ppm) überlagert. Aus der Größe der Kopplungskonstanten läßt sich nun die relative Konfiguration des Pyranoserings ablesen :

Beim Einstrahlen der Frequenz von 5-H wird einmal das CH_3-Dublett (J = 6,2 Hz) zum Singulett. Das 4-H Signal vereinfacht sich zum Dublett mit J = 3 Hz, entsprechend der noch verbleibenden Wechselwirkung mit 3-H. Gibt man die Frequenz von 3-H vor, wird das 4-H Quadruplett ebenfalls zum Dublett, jedoch mit J = 9,5 Hz, der Kopplungskonstanten 4-H/5-H. Danach müssen 5-H und 4-H axial/axial, 4-H und 3-H jedoch axial/äquatorial zueinander stehen. Es bleibt noch die Stellung von 1-H und 3-H zueinander. Beide Protonen beeinflussen die geminalen H-Atome an C-2. Strahlt man die Frequenz von 1-H ein, so geben $2\text{-}H_e$ und $2\text{-}H_a$ nur noch je vier Linien. Die größere Kopplungskonstante (beiden 4-Linien Signalen gemeinsam) von J = 14 Hz entspricht der geminalen Kopplung. Daneben kann man Kopplungskonstanten von 4 und 3,3 Hz ablesen. Das 2,12-Signal, das aufgrund seiner Lage bei tieferem Feld zu $2\text{-}H_e$ gehört, gibt mit $3\text{-}H_e$ die größere Kopplung. Ein letzter Doppelresonanzversuch (Einstrahlen der Frequenz von $3\text{-}H_e$) zeigt, daß die Kopplungskonstante von 1-H mit $2\text{-}H_a$ 9,2 Hz , mit $2\text{-}H_e$ nur 2,3 Hz beträgt. 1-H steht demnach axial ; die Methylgruppe äquatorial .

Somit liegt das ß-Methylglykosid einer 2,6-Didesoxy-hexapyranose vor. Der Stellung der Wasserstoffatome an C-3, C-4 und C-5 gemäß (äquatorial, axial, axial) hat sie ribo-Konfiguration. Es handelt sich also, wie schon im vorigen Abschnitt bewiesen, um Digitoxose (3 oder Antipode) .

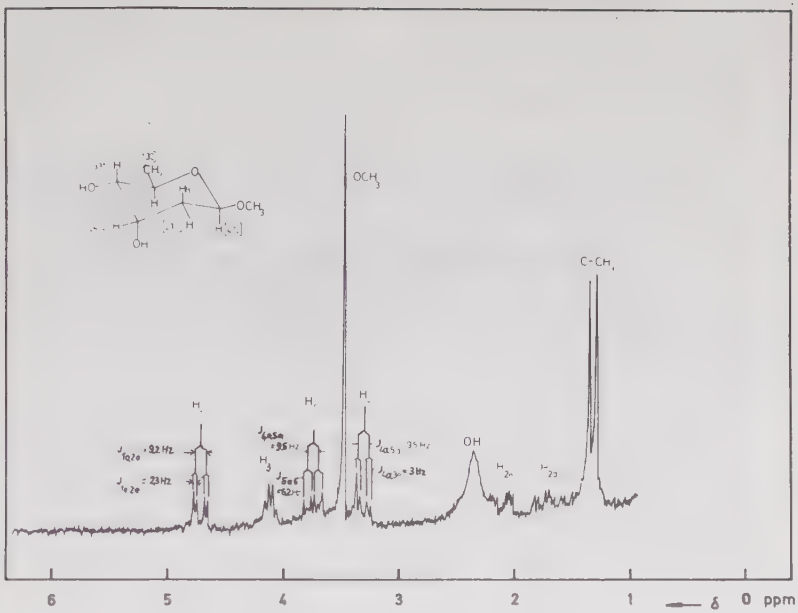
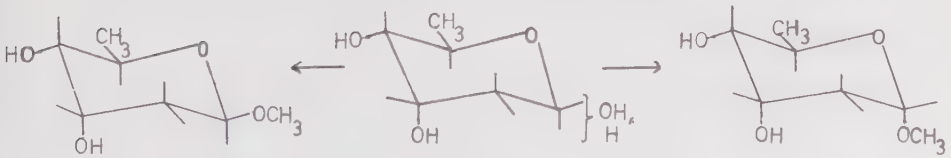


Abb. 7 : 100 Mhz ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$) von Methyl-glykosid I aus α-Lipomycin (ß-Methyl-digitoxosid)



5 3 6

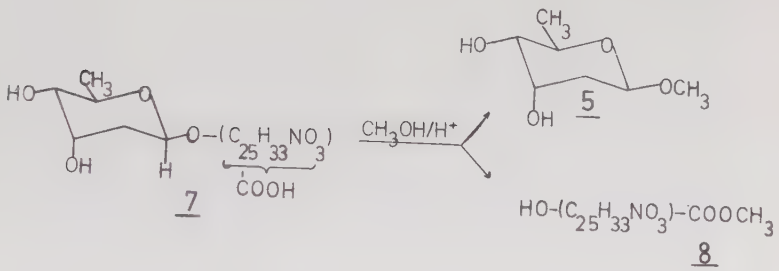
E. Absolute Konfiguration

Die Einordnung des α-Lipomycin-Zuckers in die D- oder L-Reihe folgt aus den Drehwerten ($[\alpha]_D^{20}$) seines ß-Methylglykosids (−19, 3° in Methanol) und der daraus durch saure Hydrolyse entstehenden 2,6-Didesoxy-hexapyranose (+42, 3° in Wasser). Diese Werte stimmen in der Richtung mit denen für D-Digitoxose (3)[25,26] und dessen ß-Methylglykosid (5)[27] überein, weichen im Betrag jedoch etwas ab, da die Substanzen aus α-Lipomycin zwar chromatographisch einheitlich, jedoch nicht kristallisiert waren. Da nach der Hudsonschen Isorotationsregel nur in der D-Reihe das ß-Anomere negativere Drehwerte als der Zucker selbst (Anomerengemisch) bzw. sein α-Anomeres hat (α-Methyl-D-digitoxosid (6) +192° in Methanol[28]), ist der α-Lipomycin-Zucker als D-Digitoxose (3) identifiziert. Dieser Zucker ist damit erstmalig als Antibiotika-Baustein aufgefunden.

Aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum des α-Lipomycin-methylesters (Abb. 3) folgt, daß D-Digitoxose ß-glykosidisch am Aglykon gebunden ist, denn von den beiden Kopplungskonstanten, die 2-H_a und 2-H_e beim glykosidischen 1-H (δ = 4, 75 ppm) hervorrufen beträgt die größere 10 Hz ($J_{1a,1e}$). Die ß-D-Kombination entspricht der Klyne-Regel, der zufolge Steroidglykoside[28] und Macrolid-Antibiotika[29] das biogenetisch plausible ß-D-, α-L-Muster zeigen.

Die chemische Verschiebung der Zuckerprotonen des α-Lipomycins (7) stimmt mit den Signallagen des ß-Methyl-D-digitoxosids (5) weitgehend überein. Die bei Methanolyse gebildete OH-Gruppe des ß-Lipomycin-methylesters (8) steht nicht in Konjugation zum Chromophor. Der Zucker des α-Lipomycins gibt sich im IR-Spek-

trum (Abb. 1) im wesentlichen nur durch eine Bande bei 1075/cm (sekundäre OH-Gruppe) zu erkennen, die dem ß-Lipomycin-Spektrum fehlt.



3) Der Lipomycin - Chromophor

A. Elektronenspektren

Die Lösungen der Lipomycine in verschiedenen Solventien sind gelb bis gelbrot. Die Farbe hängt nicht nur von der Art des Lösungsmittels, sondern auch vom pH-Wert ab. Weiterhin hat sich gezeigt, daß am Chromophor Doppelbindungen beteiligt sind : Beim Hydrieren unter milden Bedingungen wird die Lösung farblos.

Solvatochromie und Indikatoreigenschaften der Lipomycine werden durch die Elektronenspektren belegt. (Abb. 8 und 9). Die Wellenlängen aller Absorptionsmaxima und ihre Extinktionswerte sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Der gelbroten Farbe der Lipomycine in Chloroform entspricht im Elektronenspektrum eine breite Absorptionsbande bei 466 mμ für α- und 461 mμ für ß-Lipomycin, die in Benzol und in Äther geringfügig hypsochrom verschoben ist. In Cyclohexan war nur der α-Lipomycin-methylester löslich. Sein Elektronenspektrum (in Chloroform, Benzol und Äther nicht von dem des α-Lipomycins zu unterscheiden) zeigt eine ausgeprägte Feinstruktur der langwelligen Absorptionsbande. In Methanol lösen sich die Lipomycine mit gelber Farbe. Die Absorptionsbande ist um etwa 60 mμ hypsochrom verschoben, deutlich verbreitert und in ihrer Extinktion erniedrigt. Basen bewirken eine geringfügige hypsochrome, Säuren eine starke bathochrome Verschiebung (bis zum λ-Wert der Chloroformlösungen); dabei steigt die Extinktion wieder an.

Der Vergleich mit dem α-Lipomycinmethylester zeigt, daß die Veresterung der Carboxylgruppe keinen Einfluß auf den Chromophor hat. Dagegen muß die bei der Äquivalentgewichtstitration des α-Lipomycins nachgewiesene zweite nicht veresterbare, saure Gruppe mit dem Chromophor konjugiert und für dessen Indikatoreigenschaften verantwortlich sein.

Einmal wird die Neutralform (gelbrot) und einmal das Anion (gelb) vermessen. Danach ist der Chromophor in reinem Methanol weitgehend dissoziert. Beim α-Lipomycin wird diese Dissoziation durch die zweite saure Gruppe (COOH) im Molekül etwas zurückgedrängt, so daß es zur Überlagerung der Banden von Neutralform und Anion kommt. Deshalb ist die Methanolbande im Vergleich zur Chloroformbande deutlich verbreitert und hat eine geringere Extinktion ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 800 gegenüber 950), erst nach Zugabe von Basen oder Säuren erreichen die verschobenen Banden die Chloroform-Extinktionswerte; α-Lipomycin-methylester zeigt in Methanol keine Bandenverbreiterung bzw. Extinktionserniedrigungen.

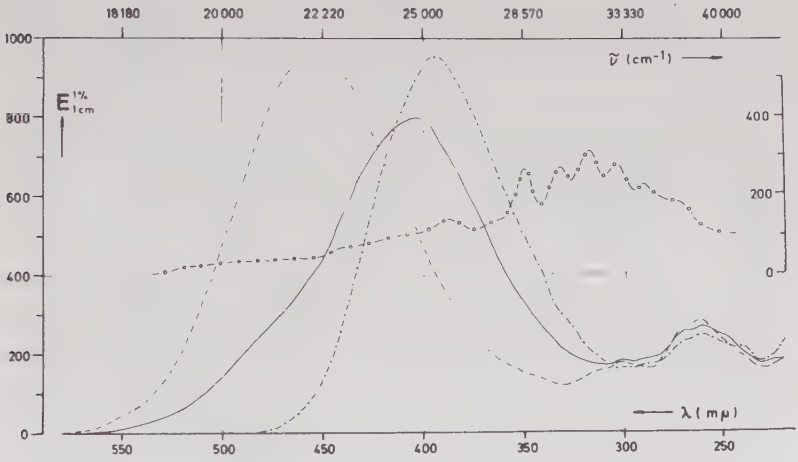


Abb. 8 : Elektronenspektren von α-Lipomycin : Methanol (—), Methanol/HCl (- - -), Methanol/NaOH (-·-·-·) α-Lipomycin (nach Reduktion mit $LiAlH_4$) in Methanol (o-o-o)

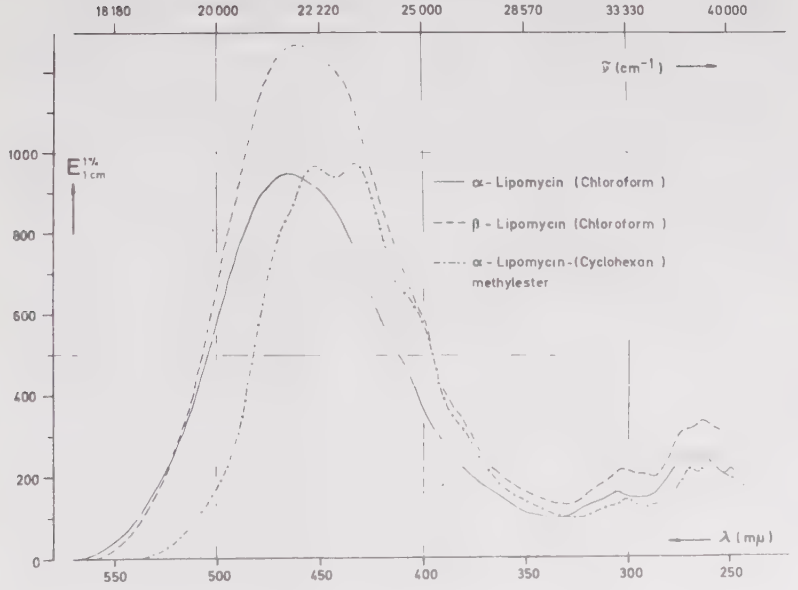


Abb. 9: Elektronenspektrenvon α-Lipomycin, α-Lipomycin-methylester und ß-Lipomycin

Tab. 5 : Absorptionsmaxima der Lipomycine in verschiedenen Lösungsmitteln
(Angaben in mμ, $E^{1\%}_{1\,cm}$ in eckigen, Schultern der Absorptionskurve in runden Klammern)

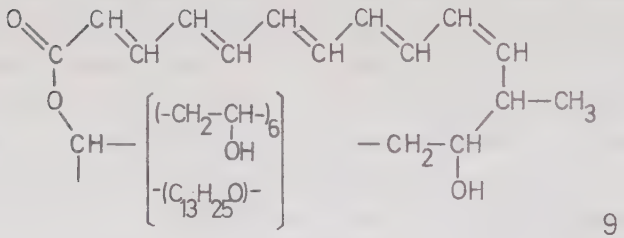
Lösungsmittel	α-Lipomycin		α-Lipomycin-methylester		ß-Lipomycin	
Chloroform	466	306, 273, 265	465	306, 274, 264	461	304, 272, 263
	[950]	[160, 240, 250]	[954]	[150, 240, 250]	[1260]	[220, 320, 340]
Methanol	403	287, 270, 260	397	286, 269, 259	(460), 399	287, 269, 260
	[800]	[180, 260, 270]	[942]	[185, 250, 260]	[1040]	[220, 320, 330]
Methanol (mit 1 Tropfen 0.1n HCl)	455	301, 267, 260	456	302, 269, 262	453	301, 269, 261
	[950]	[180, 270, 280]	[965]	[160, 255, 260]	[1260]	[215, 330, 345]
Methanol (mit 1 Tropfen 0.1 n NaOH)	393	285, 269, 259	395	286, 269, 259	393	287, 269, 260
	[953]	[180, 230, 250]	[971]	[170, 220, 230]	[1260]	[220, 300, 315]
Äther	450, 437, (410),	300, 270, 260	449, 438, (406),	300, 269, 260	446, 438, (407),	300, 270, 260
Benzol	460, (445)	305	460, (446), (413)	305	450	304
Cyclohexan	unlöslich		453, 434, (410), (384) [967, 974, 650, 330]	301, 271, 261 251 [145, 220, 240, 215]	unlöslich	

In aprotischen Lösungsmitteln sind Unterschiede in der Bandenlage als Solvatochromie zu deuten.

Da die Titrationskurve des α-Lipomycins nur eine Stufe anzeigt, sollten Carboxyl-und Chromophor-Proton vergleichbare Acidität haben. Im Gegensatz zu α-Lipomycin löst α-Lipomycinmethylester sich nicht mehr in wäßrigem Alkali (pH>7). Beim Schütteln einer Cyclohexanlösung mit wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung bildet der Ester ein gelbes Salz in der Grenzschicht. Aus Ätherlösungen wird er nicht extrahiert ; es ändert sich lediglich das Elektronenspektrum des Äthers (Farbumschlag von gelbrot nach gelb). Aus Chloroform ist der Ester weder extrahierbar, noch ändert sich das Spektrum der organischen Phase. Erst Zugabe von methanolischer NaOH bewirkt den Farbumschlag.

Durch die langwellige Absorption ($\varepsilon = 56 \cdot 10^3$) bei einem Mol. -Gew. von 587 für α-Lipomycin und die um den Faktor 4 geringere Extinktion ($\varepsilon = 14,5 \cdot 10^3$) der kurzwelligen Bande ist das Spektrum vom Typ her den Polyenspektren ähnlich [30, 31]. Der Abstand der Hauptmaxima im Cyclohexan-Spektrum des α-Lipomycin-methylesters (453 , 434 mμ = 1000/cm) entspricht jedoch nicht dem für Polyene typischen : 1450-1500/cm [30]. Abgesehen davon hat ein Polyen, das so langwellig absorbiert, neun bis elf Doppelbindungen, z. B. ß-Carotin : λ_{max} = 448 und 478 mμ und Dimethylnonaen : λ_{max} = 441 und 413 mμ [31]. Die bei den meisten Lösungsmitteln fehlende Feinstruktur der langwelligen Lipomycinbande kann man durch Annahme einer konjugierten Carbonylgruppe erklären. Beispiele hierfür finden sich ebenfalls unter den Carotinoiden : ß-apo-8'-Carotensäureäthylester, dessen Chromophor von neun konjugierten Doppelbindungen und dem anschließenden Estercarbonyl gebildet wird, hat ein breites Absorptionsmaximum bei 446 mμ (Schulter bei 468 mμ) in Äthanol, während in Hexan zwei getrennte Maxima (439 und 467 mμ) sichtbar

werden. Flavomycoin (9) [32], ein Pentaen mit anschließendem Lactoncarbonyl, zeigt auch nur eine breite unstrukturierte Absorptionsbande (363 mμ/Äthanol).



9

Flavomycoin (Partialformel)

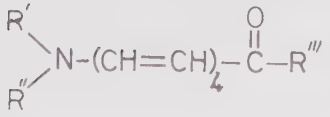
Anhand der Spektren kann man für die Lipomycine einen Chromophor bestehend aus einer Carbonylgruppe und acht oder neun Doppelbindungen fordern. Um seine Indikatoreigenschaften zu erklären, muß man ihn noch mit einer Säurefunktion, vermutlich kombiniert mit der Carbonylgruppe, in Verbindung bringen. Erste quantitative Hydrierungsversuche und osmometrische Bestimmung des Mol.-Gew. von α-Lipomycin brachten Ergebnisse, die damit übereinzustimmen schienen. Ein Äquivalentgewicht von 119 bedingt bei einem Molgewicht von 1060 nahezu neun Doppelbindungen.

Diese Annahme mußte allerdings aufgegeben werden, als durch die Massenspektren der Ester das tatsächliche Mol.-Gew. bekannt wurde (α-Lipomycin : 587 und ß-Lipomycin : 457). Dies läßt nur noch vier oder fünf konjugierte Doppelbindungen zu, was auch besser mit dem ^{1}H-NMR-Spektren im Einklang steht, das nur acht bis neun olefinische Protonen anzeigt. Für ein Octa-oder Tetraen müßte man dann ein symmetrisches Dimeres annehmen

und jedes Signal im ^{1}H-NMR-Spektrum (s. Kap. IV, 2) müßte die doppelte Anzahl äquivalenter Protonen anzeigen als bisher angenommen.

Ein Tetraen- oder Pentaenchromophor, auch in Konjugation zu einer Carbonylgruppe, kann nicht die Absorption bei 466 mμ verursachen. Das schon erwähnte Flavomycin (9) [32] (Pentaen + Lactoncarbonyl) zeigt ein Absorptionsmaximum bei 363 mμ und weicht damit vom Lipomycinchromophor um 100 mμ ab. Eine zweite konjugierte Carbonylgruppe brächte keine wesentliche Veränderung, wie der Vergleich verschiedener Carotinoide zeigt [31]: z. B. ß-Carotin (9 konj. Doppelbindungen), Echinenon (9 konj. Doppelbindungen und eine Carbonylgruppe) und Cantaxanthin (9 konj. Doppelbindungen und zwei Carbonylgruppen) haben alle ihr Absorptionsmaximum um 450 mμ (448, 458 bzw. 465 mμ). Die langwellige Absorption des Lipomycin-Chromophors muß also anders erklärt werden.

Der π-π^{*} Übergang in einem Polyenchromophor wird entscheidend erleichtert, wenn sich an den Enden des Konjugationssystems Elektronenacceptor und -donatorgruppen gegenüberstehen. Da die Lipomycine auch Stickstoff enthalten, ließe sich ein Merocyanin analog 10 formulieren:



10

Für die Modellverbindung mit R', R'' = $-CH_3$ und R''' = H findet man in Methylenchlorid ein dem des Lipomycins ähnliches Spektrum mit λ_{max} = 462,5 mμ [33]. Ein analoges Strukturelement in den Lipomycinen würde aber nicht die pH-Abhängigkeit der langwelligen Absorptionsbande erklären, denn Merocyanine sind als vinyloge Säureamide neutral.

Alle bisherigen Überlegungen machen deutlich, daß die Lipomycine einen anderen Chromophortyp enthalten müssen : Er umfaßt mehrere zum Teil oder durchgehend konjugierte Doppelbindungen, Carbonylgruppen und eine saure Funktion. ß-Lipomycin enthält insgesamt sechs Sauerstoffatome. Davon gehören zwei zur veresterbaren Carboxylgruppe, eins zur Hydroxylgruppe, die im α-Lipomycin für die glykosidische Bindung des Zuckers gebraucht wird. Es bleiben noch drei Sauerstoffunktionen, die dem Chromophor angehören können (evtl. zwei Carbonylgruppen und eine saure Hydroxylgruppe).

Die Aufklärung des Chromophors sollte auf folgenden Wegen möglich sein.

1) Reduktion der Lipomycine mit Lithiumaluminiumhydrid (Wenn eine Carbonylgruppe zum Polyenteil konjugiert steht, sollte sich eine Veränderung im Elektronenspektrum des Polyens ergeben).

2) Hydrierung unter selektiven Bedingungen (Art und Anzahl der olefinischen Doppelbindungen ließen sich so bestimmen ; die Hydrierungsprodukte wären zu untersuchen, um Hinweise auf den Restchromophor zu erhalten).

B. Reduktion mit $LiAlH_4$

Beim Flavomycoin (9)[32] konnte durch Reduktion mit Lithiumalanat in absol. Tetrahydrofuran ein Pentaenchromophorteil nachgewiesen werden. Die konjugierte Carbonylgruppe wird zur Hydroxygruppe reduziert, die die Polyenbanden nicht mehr beeinflußt. Das Elektronenspektrum des Reduktionsproduktes entspricht einem Pentaen. Zu bedenken ist dabei, daß drastische Reaktionsbedingungen zu einer Veränderung des Polyenteils führen. Meistens wird dabei die zur Carbonylgruppe benachbarte Doppelbindung mit reduziert. In einigen Fällen tritt dies auch unter milden Reaktionsbedingungen ein[34].

Umsetzung von ß-Lipomycin mit Lithiumalanat führte zu blaßgelben Produkten, die im Elektronenspektrum Hauptbanden zwischen 350 und 280 mμ zeigen, während das Absorptionsmaximum bei 466 mμ verschwunden ist. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches hängt von den Reaktionsbedingungen ab : Nach 10 Stdn. bei -15° sind die Maxima bei 353, 335, 318.5 , 304 und 290 mμ ungefähr gleich intensiv (Abb. 8) ; wird 15 Min. bei 20° reduziert, so sinkt die Intensität der ersten beiden Banden ; nach Kochen am Rückfluß sind diese Banden nur noch schwach erkennbar, und neben den Maxima bei 318 und 303 verstärkt sich die Absorption bei 285 und 275 mμ. Die Lage der Hauptbanden ist unabhängig vom pH-Wert und ändert sich geringfügig mit der Polarität des Lösungsmittels.

Diesen Befunden nach steht konjugiert zur Polyenkette des Chromophors eine Carbonylgruppe, deren Reduktion zum Hydroxyl von einer unerwartet großen hypsochromen Verschiebung der Hauptbande begleitet ist. Aufgrund der Bandenlage und dem Banden abstand liegen im Reaktionsprodukt Verbindungen mit Pentaen- bzw. Tetraenchromophor nebeneinander vor. Die beiden ersten

Maxima gehören zum Pentaen (353, 335 mμ) (vergl. Eurocidin: λ_{max} = 352, 334, 319 mμ [35]). Bei 318,5 mμ überlagern sich die dritte Bande des Pentaens und die erste des Tetraens (vergl. Tetrin-A : 318, 303 und 290 mμ [35]). Damit ist gezeigt, daß die Lipomycine eine Pentaenkette enthalten. Daß in einer weitergehenden Reaktion auch noch bis zum Tetraen reduziert wird, war nach den Versuchsbedingungen zu erwarten [34].

Schlegel und Thrum [32] beschreiben im Zusammenhang mit dem Flavomycoin (9) den Einfluß der Temperatur auf das Elektronenspektrum. Die bei Zimmertemperatur unstrukturierte breite Bande zeigt bei -196° die typische Polyen-Feinstruktur (Aufspaltung in drei Maxima). Für die Lipomycine ist ähnliches zu erwarten, jedoch stand für die Messung bei tiefen Temperaturen kein Apparat zur Verfügung.

C. . Katalytische Hydrierung

Daß die Lipomycine mit Wasserstoff in Gegenwart von Katalysatoren zu farblosen Verbindungen reduziert werden, zeigten schon die qualitativen Vorversuche. Von der näheren Untersuchung der Hydrierung versprach ich mir Aufschluß über die Zahl der Doppelbindungen und die Art des Restchromophors. Zudem sollte versucht werden, durch Hydrierung die empfindlichen Lipomycine in stabilere Derivate zu überführen, die sich besser reinigen lassen.

Die ersten Hydrierungsversuche wurden mit Palladium-Katalysatoren (10% Pd auf Aktivkohle) und Methanol als Lösungsmittel durchgeführt. Unter rascher Aufnahme von 4 bis 5 Mol H_2 entfärbte sich die Lösung. Die Wasserstoffaufnahme verlangsamte sich, und nach mehreren Stunden waren nochmals 4 bis 5 Mol H_2 verbraucht. Die Steigung der Hydrierkurve fällt nach 4 bis 6 Mol deutlich ab,

jedoch ist der Knick so unscharf, daß sich nicht sicher entscheiden läßt, ob 4, 5 oder 6 gleichwertige Doppelbindungen vorhanden sind. Es mußte also nach besseren Hydrierungsbedingungen gesucht werden.

Das Hydrierungsprodukt war nach Aufnahme von 4 bis 6 Mol H_2 noch relativ einheitlich. Erst danach entstand ein unübersichtliches Produktgemisch. Es wurde nun versucht, nach kurzer Hydrierung unter den genannten Bedingungen ein einheitliches Hydrierungsprodukt zu isolieren. Das Hauptprodukt verhielt sich im Dünnschichtchromatogramm ähnlich wie die Lipomycine, war aber bei der Chromatographie an 0,5 n-Oxalsäure-Kieselgel schlecht auffindbar. An neutralen Adsorbentien bildet das Hydrierungsprodukt bei Verwendung polarer Laufmittel lediglich langgezogene Zonen. So wurde versucht, durch Veresterung eine weniger polare Verbindung herzustellen. Umsetzung mit Dimethoxypropan in saurer methanolischer Lösung führte beim hydrierten α- und ß-Lipomycin zu demselben Hauptprodukt, das sich an neutralem Kieselgel immer noch nicht chromatographieren ließ. Erst Einwirken von Diazomethan während 10 bis 15 Min. bei Zimmertemperatur gab ein Produkt, das man an Dickschichtplatten aus neutralem Kieselgel mit Chloroform/Methanol (97 :3) als Laufmittel reinigen konnte. Es fiel als farbloses instabiles Öl an. Sein ^{1}H-NMR-Spektrum (Signale unstrukturiert und verbreitert) liefert folgende Hinweise : Es werden keine Olefin-Protonen mehr angezeigt, dafür taucht ein breites Singulett bei δ = 1, 25 ppm auf, entsprechend 16-18 aliphatischen Methylenprotonen. Ebenso fehlt das Signal der olefinischen Methylgruppe (δ = 1, 80 ppm) . Das Multiplett (δ = 0, 89–0, 97 ppm) entspricht nunmehr 4 aliphatischen CH_3-Gruppen. Bei δ = 3, 6 ppm ist ein Estermethoxylsignal festzustellen. Die übrigen Signale kann man auch bei Vergleich mit dem ß-Lipomycin-Spektrum nicht zuordnen. Es ist anzunehmen, daß mit Diazomethan noch uner-

wünschte Nebenreaktionen stattfinden. Im weiteren Verlauf der Arbeit habe ich keine Bemühungen mehr darauf verwendet, ein verestertes Hydrolipomycin zu reinigen.

Um die Anzahl der Doppelbindungen durch Hydrierversuche genau zu bestimmen, wurden verschiedene Versuchsbedingungen geprüft. Unter möglichst milden Bedingungen sollten nur die besonders reaktiven Doppelbindungen hydriert werden ; unter rigiden Bedingungen dann auch die anderen einschließlich der Carbonylgruppen. Da es zum Zeitpunkt der Hydrierversuche noch nicht gelungen war, α – und ß-Lipomycin völlig vom Cyclohexan zu befreien, wurde dessen Gehalt durch das ^{1}H-NMR – Spektrum und anhand der Extinktionswerte des UV-Spektrums bestimmt und bei der Berechnung des Äquivalentgewichts berücksichtigt.

Die Suche nach milden Reaktionsbedingungen führte schließlich zur Verwendung von 5% Palladium auf Bariumsulfat und absolutem Tetrahydrofuran (Reinigung nach E. Schulze[36]) als Lösungsmittel. Die Wasserstoffaufnahme kommt schon nach kurzer Zeit zum Stillstand. Die Hydrierkurve zeigt einen Knick bei 5 Mol-Äquivalenten (I in Abb. 10). Demnach enthalten die Lipomycine fünf leicht hydrierbare Doppelbindungen, was mit den Ergebnissen der Lithiumalanat-Reduktion im Einklang steht.

Wird mit PtO_2 in Eisessig hydriert, so verbrauchen die Lipomycine 6 Mol H_2, also 1 Mol mehr. In der Hydrierkurve (II in Abb. 10) erkennt man zwei deutliche Knicks, einen nach 5 Mol-Äquivalenten H_2-Aufnahme, den anderen nach 6 Mol-Äquivalenten. Zusätzlich zu fünf besonders reaktiven Doppelbindungen wird eine weitere weniger reaktionsfähige nachgewiesen. Die darüber hinaus bis zum Stillstand nach mehreren Stunden aufge-

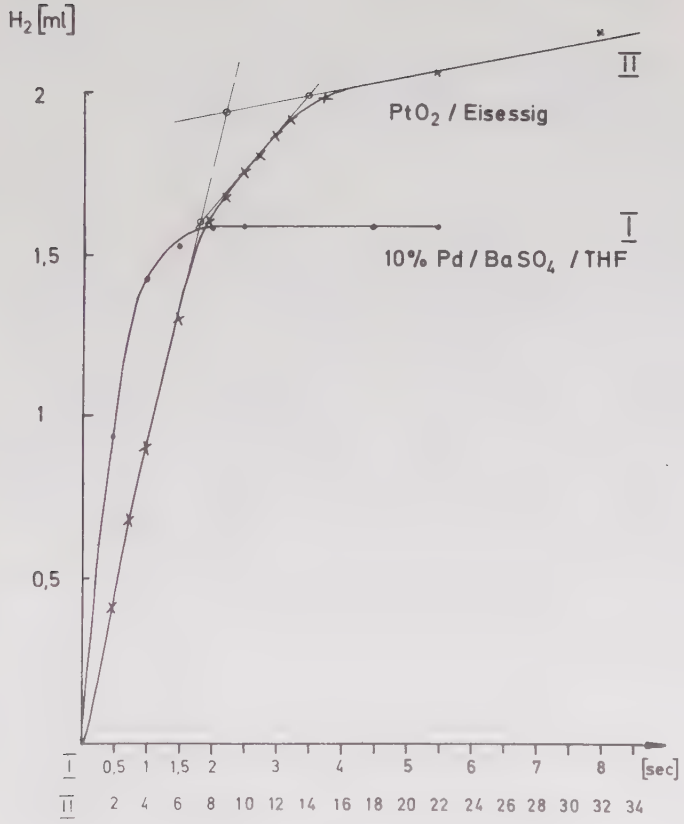


Abb. 10 : Hydrierung von ß-Lipomycin

nommene Wasserstoffmenge entspricht mehr als zwei Äquivalenten. Der ermittelte Wert ist jedoch fehlerhaft.

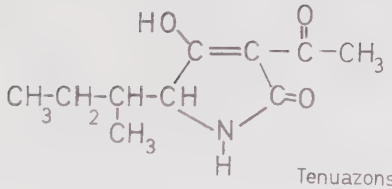
Die Hydrierungsprodukte werden im folgenden Decahydro-ß-lipomycin (Aufnahme von 5 Mol-Äqu. H_2) und Perhydro-ß-lipomycin (Aufnahme von mind. 8 Mol-Äqu. H_2) genannt. Die isolierten und nicht weiter gereinigten Mengen (ca. 5 mg) reichten zur Messung von IR- und UV-Spektren aus. Im Carbonylbereich des IR-Spektrums zeigt Decahydro-ß-lipomycin zwei Banden, eine bei 1710/cm und eine breite bei 1613/cm mit Schultern bei 1639 und 1656/cm. Während die erste relativ eindeutig einer Ketogruppe zuzuordnen ist, kann man die andere nicht allein durch eine Carboxylgruppe erklären. Das Perhydro-ß-lipomycin-Spektrum dagegen weist nur eine Bande bei 1670/cm auf, die eher einer Carboxylgruppe entspricht. Dafür ist die Intensität der Hydroxylbande bei 3400/cm weitaus höher als beim Decahydro-ß-lipomycin-Spektrum, was darauf hindeutet, daß die Carbonylgruppen zu Hydroxygruppen hydriert wurden.

Die UV-Spektren geben eindeutigere Informationen. Das des Perhydro-ß-lipomycins in Äthanol zeigt nur Endabsorption, d. h. in Übereinstimmung mit dem IR-Spektrum sind keine Ketogruppen mehr vorhanden. Decahydro-ß-lipomycin dagegen zeigt zwei Absorptionsmaxima (bei 285 und 223 mμ ; Abb. 10a), von denen das langwelligere ungefähr doppelt so hoch ist wie das kürzerwellige. Zudem beobachtet man Veränderungen bei Zugabe von Säuren oder Basen. In äthanolischer 0,1 n Salzsäure ändert sich die Lage der langwelligen Bande nur geringfügig. Sie ist auch in 0,1 n äthanolischer NaOH kaum verändert. Dagegen verschiebt sich die kürzerwellige Bande um 21 mμ bathochrom auf 244 mμ bei gleichzeitiger Zunahme der Extinktion. Dieses unterschiedliche Verhalten von Neutral- und Anionform ähnelt sehr dem zweier Pilzmetaboliten : Tenuazonsäure (11)[37] und dem Decahydroderivat des Erythroskyrins (12)[38].

Ihre Banden stimmen mit denen von Decahydro-ß-lipomycin nahezu überein. Die entsprechenden Daten sind in Tab. 6 zusammengestellt.

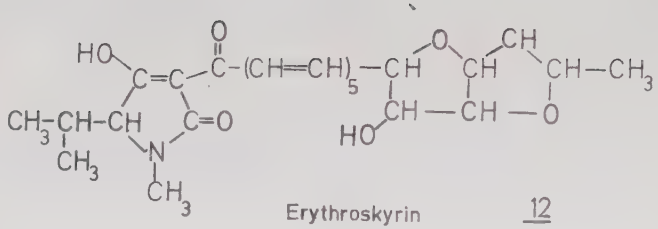
Tab. 6 : Absorptionsmaxima (λ_{max} in mμ) und Extinktionen (log ε) von Decahydro-ß-lipomycin, Tenuazonsäure (11) und Decahydro-erythroskyrin

	Äthanol	0,1 äthanol. NaOH	0,1 äthanol. HCl
Decahydro-ß-lipomycin	285 (4,13) 223 (3,86)	284 (4,08) 244 (4,09)	283 (4,09) 223 (3,86)
Tenuazonsäure (11)	277 (4,13) 217 (3,86)	279 (4,17) 240 (4,07)	277 (4,10) 220 (3,80)
Decahydro-erythroskyrin	284 (4,04) 225 (3,86)	288 (4,15) 246 (4,15)	---- ----



11

Tenuazonsäure



Erythroskyrin 12

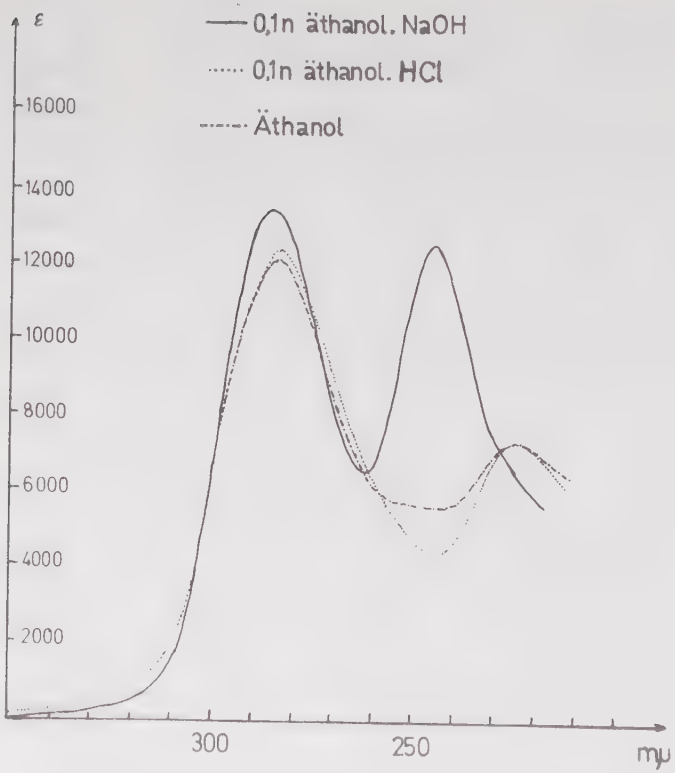
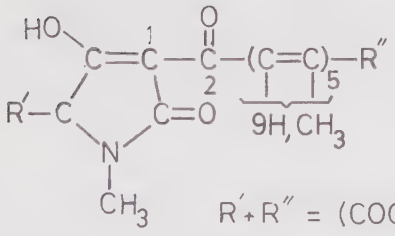


Abb. 10a : UV-Spektren von Decahydro-ß-lipomycin

Decahydro-erythroskyrin und Tenuazonsäure (11) haben beide den Tetramsäure-Fünfring, der in α- und γ-Stellung substituiert ist. Der α-Substituent beginnt mit einer Carbonylgruppe ; dadurch entsteht ein ß-Triketonsystem, das die beschriebene UV-Absorption verursacht. Als Enol gibt es sich durch Rotfärbung mit Eisen(III)-chlorid (äthanolische Lösung) zu erkennen. Dies beobachtet man auch für Decahydro-ß-lipomycin. Zudem zeigt ein Vergleich von Erythroskyrin (12) mit ß-Lipomycin selbst, daß gewisse Analogien im ^{1}H-NMR-Spektrum bestehen. Der komplexe Signalhaufen im Bereich δ = 6-8 ppm für olefinische Protonen ist beiden gemeinsam. Im Aliphatenbereich findet man übereinstimmend das 2,97- Signal für Säureamid-N-CH_3.

Die Daten erlauben es, für die Lipomycine einen Chromophor zu fordern, der ebenfalls den α,γ-substituierten N-Methyl-tetramsäure-Fünfring enthält, der in α-Stellung über eine Carbonylgruppe mit einer Pentaenkette verknüpft ist. Im Gegensatz zum Erythroskyrin(12) enthält die Pentaenkette neben neun Olefin-Protonen eine olefinische C-CH_3-Gruppe.



13

R′ + R″ = (COOH, OH, 3 CH_3, C_5H_7)

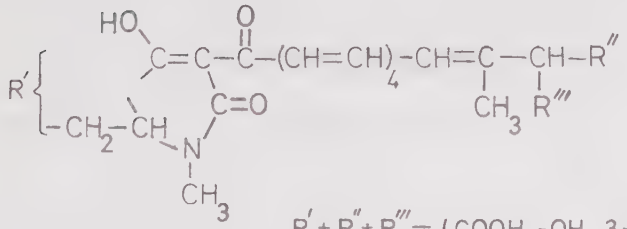
Alle drei Verbindungen, Tenuazonsäure (11), Decahydro-erythroskyrin und Decahydro-ß-lipomycin sind sehr empfindlich gegen Säure, ebenso Erythroskyrin (12) und die Lipomycine selbst. Besonders leicht wird die Bindung zwischen α-C-Atom des Tetramsäure-Fünfrings und dem Carbonyl-C-Atom des Substituenten gespalten. Aus Tenuazonsäure konnte so Essigsäure isoliert werden. Man kann daher verstehen, warum die Lipomycine sich leicht an saurem Kieselgel zersetzen. Säurespaltung zwischen C-1 und C-2 in 13 sollte unter anderem eine Pentaencarbonsäure geben, die wie Flavomycoin (9) z. B. gelb gefärbt ist., wegen ihrer Instabilität jedoch rasch weiter zerfällt.

Die lediglich aufgrund von Analogieschlüssen entwickelte Partialstruktur 13 des ß-Lipomycins muß noch geändert werden. Das Triplett (δ = 3.19 ppm, J = 6 Hz, 1 H) im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 2 und 3) stammt von der CH-Gruppe, die der N-CH_3-Gruppe benachbart steht und von einer CH_2-Gruppe aufgespalten wird. Man kann nicht entscheiden, ob die CH_2-Gruppe exocyclisch ist (Fünfringformel 13) oder zu einem Ring gehört (Sechsringformel). Ihr Signal ist im Bereich δ = 2.0 – 2.6 ppm zu suchen. Entsprechende Doppelresonanzversuche in $CDCl_3$ geben keine deutliche Entkopplung. Lediglich in C_6D_6, wo der betreffende Signalbereich etwas zu höherem Feld verschoben ist, findet man für die fragliche CH_2-Gruppe einen δ-Wert von 1.94 ppm. Das Triplett (nunmehr bei δ = 3.05 ppm) wird zu einem breiten Singulett entkoppelt. Es ist möglich, daß die beiden Protonen der Methylengruppe nicht äquivalent sind. Sie stehen benachbart zu einem Asymmetriezentrum, das von der Methingruppe, einerlei ob Fünf- oder Sechsringformel, gebildet wird. Dann hätte man es mit einem ABX-Spektrum zu tun, und das 3.19-Signal als X-Teil sollte aus vier Linien bestehen, was man z. B. im D_6-Aceton-Spektrum

des ß-Lipomycin auch beobachtet. Daß in anderen Lösungsmitteln nur ein Triplett mit verbreiterten Signalen auftritt, kann durch Signalüberlappung zustande kommen, wenn J_{AX} und J_{BX} nicht sehr voneinander verschieden sind. Der AB-Teil gibt einen Signalhaufen von 8 einander zum Teil überlappenden Einzelsignalen über den Bereich 2.0-2.6 ppm, so daß Entkopplung durch Doppelresonanz nicht möglich ist.

Ferner ließ sich durch Doppelresonanzversuche beweisen, daß das Olefindublett δ = 5.67 ppm beim Einstrahlen des 2.73-Signals entkoppelt wird. Das heißt: Am Ende der Pentaenkette steht ein Olefin-H, das mit einem tertiären Aliphat-H koppelt, während das benachbarte Olefin-C kein H-Atom, sondern die im NMR-Spektrum nachgewiesene olefinische C-Methylgruppe (δ = 1.83 ppm) trägt.

Diesen Befunden gemäß kann 13 durch Partialformel 14 ersetzt werden.



14

$R' + R'' + R''' = (COOH, -OH, 3\text{-}CH_3, C_3H_4)$

4. Oxidativer Abbau der Lipomycine

Ausgehend von der Partialformel 14 für ß-Lipomycin konnte ich die weitere Strukturermittlung der Lipomycine planen. Die unbekannten Reste R', R" und R"' waren zu ergänzen, und zwischen Fünf- und Sechsringformel mußte entschieden werden. Auch für die Kohlenstoffkette des Chromophors sollte der chemische Beweis geliefert werden. Es schien mir günstig, die Lipomycine nach vorheriger Hydrierung oxidativ abzubauen und aus den identifizierten Reaktionsprodukten die Ausgangsverbindung zu rekonstruieren. Dieses Vorgehen hat sich bei der Ermittlung des C-Atomgerüsts komplizierter Naturstoffe bewährt, wie z. B. Untersuchungen an Polyenantibiotika zeigen [32, 39, 41, 42].

Der oxydative Abbau der Lipomycine gliedert sich so in zwei Abschnitte :

a) Strukturermittlung der Pentaenseitenkette (Aufklärung von R" und R"')

b) Strukturermittlung des heterocyclischen Rings (Aufklärung von R')

Dem zeitlichen Verlauf der Arbeit gemäß möchte ich den Abschnitt a) zuerst behandeln.

A. Die Struktur der Pentaenseitenkette

1. Allgemeines

Ich faßte zwei Möglichkeiten ins Auge, das Kohlenstoffgerüst des Polyenchromophors oder Teile davon in Form von Abbauprodukten in die Hand zu bekommen. Ausgehend von der hydrierten Verbindung, in diesem Fall dem Decahydro-ß-lipomycin, kann ein

oxidativer Abbau durch Abrauchen mit konz. Salpetersäure oder – milder – durch Chrom(VI)-oxid in Eisessig erfolgen. Im Decahydro-ß-lipomycin sollten oxidierbare C-Atome zu beiden Seiten des ehemaligen Polyenteils unter C-C-Bindungsbruch in Carboxylgruppen übergehen. Sind R'' und R''' Alkylgruppen, so entsteht nach Spaltung zwischen C-1 und C-24 eine Monocarbonsäure mit mehr als 13 C-Atomen. Enthalten R'' oder R''' jedoch die fehlende Carboxyl- oder Hydroxylgruppe, so werden Dicarbonsäuren nachzuweisen sein.

Wie ein Vergleich der Arbeit von Bohlmann u. a.[39] mit der von Schlegel und Thrum[32] zeigt, sollte die Wahl des Oxidationsmittels auf die entstehenden Abbauprodukte keinen wesentlichen Einfluß haben. Bohlmann und Mitarbeiter isolierten nach Hydrieren und Abrauchen mit konz. Salpetersäure aus dem Heptaen-Antibioticum DJ 400 eine Heptadecan-dicarbonsäure. Schlegel und Thrum reduzierten das hydrierte Flavomycoin (9) erst mit Lithiumalanat (wohl um für alle oxidierbaren Zentren gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen) und oxidierten dann mit der fünffachen molaren Menge Chrom(VI)-oxid pro Sauerstoff-Funktion. Sie erhielten ebenfalls eine aliphatische Dicarbonsäure (2-Methyl-tridecan-1,13-dicarbonsäure). Es sollte also ausreichen, eine der beiden Methoden auf Decahydro-ß-lipomycin anzuwenden. Tatsächlich habe ich beide Reaktionen durchgearbeitet, denn erst durch die Kombination gelang es, die Struktur der Seitenkette zu beweisen.

Aliphatische Sauerstoffverbindungen mit konz. HNO_3 abzurauchen, ist eine recht drastische und nicht sehr spezifische Oxidationsreaktion. Zwar wird zuerst an sauerstofftragenden und ungesättigten C-Atomen oxidiert ; es treten jedoch auch Nebenreaktionen (vornehmlich durch Oxidation an tertiären C-Atom

auf. Für präparative Zwecke ist dies natürlich unerwünscht. Bei der Strukturermittlung kann es jedoch von Vorteil sein, da weniger komplizierte Nebenprodukte leichter identifiziert werden können und ihr Entstehen aus dem Hauptprodukt wichtige Rückschlüsse auf dessen Struktur zuläßt.

Oxidation mit Chromsäure, auch bei erhöhten Temperaturen, verläuft wesentlich spezifischer. Die Bildung von Nebenprodukten ist geringer, deshalb wird diese Reaktion vorgezogen, wenn es auch auf Ausbeuten ankommt. Zudem kann man die Versuchsbedingungen wie Temperatur, Oxidationsmittelkonzentration und Versuchsdauer in weiten Grenzen variieren und so einen stufenweisen Abbau ermöglichen. Unter sehr milden Reaktionsbedingungen sind sogar Aldehyde und Ketone zugänglich.

2. Salpetersäureoxidation

a. Reaktionsbedingungen und Trennung der Oxidationsprodukte

Die höchsten Ausbeuten an Abbausäuren (ca. 50%) erhielt ich, wenn Decahydro-ß-lipomycin mit wenig konz. Salpetersäure kurze Zeit auf 110° erhitzt wurde. Nach 3-4 Min. hörte die Stickoxidentwicklung auf. Das mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch extrahierte man mit Butanol und veresterte die im Butanolextrakt enthaltenen Carbonsäuren mit ätherischer Diazomethanlösung.

Die Trennung des Methylestergemisches erfolgte gaschromatographisch an einer Säule mit Butandioladipat (BDA) auf Chromosorb-W (Abb. 11). Die Substanzen mit längster Retentionszeit (Peak A und B) waren die Hauptprodukte. Daneben wurden sechs weitere in größeren Mengen entstandene Substanzen untersucht (Peak C bis H)

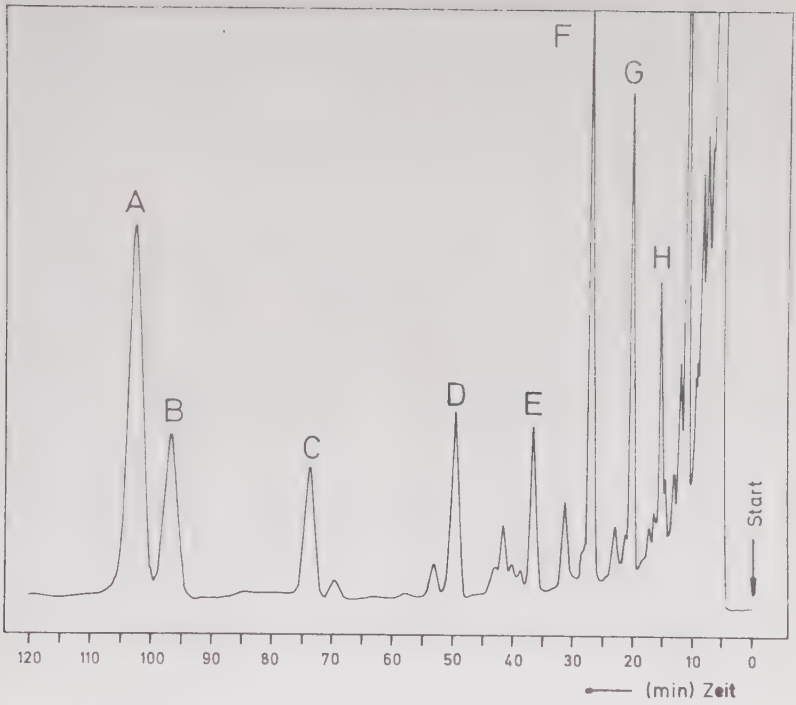


Abb. 11 : Gaschromatogramm des Methylestergemisches der Salpetersäure - Oxidation

b. Summenformeln der Oxidationsprodukte und Vergleich der Retentionszeiten

Mit Hilfe des GC/MS-Kombinationsgeräts erhielt man von den Komponenten A bis G die Massenspektren. Danach handelt es sich durchweg um Dicarbonsäure-dimethylester, denn das Ion bei höchster Massenzahl ist ungradzahlig und entsteht durch Abspaltung von Methoxyl aus dem Molekülion [32, 40]. Die somit indirekt bestimmbaren Molekulargewichte und Summenformeln stehen mit

denen für gesättigte Dicarbonsäure-dimethylester berechneten im Einklang. Die Daten für die Verbindungen A bis G sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Auffallend ist, daß die beiden Hauptkomponenten A und B identische Massenspektren liefern. Bei der Oxidation des Decahydro-ß-lipomycin entstehen demnach zwei isomere C_{15}-Dicarbonsäuren als Hauptprodukt.

Durch den gaschromatographischen Vergleich mit einem authentischen Dicarbonsäure-dimethylester-Gemisch (C_4-C_9) wird deutlich, daß den Estern E bis H unverzweigte Dicarbonsäuren zugrunde liegen (C_7 bis C_{10}). Beim Auftragen der C-Atomzahl gegen den Logarithmus der Retentionszeit erhält man eine Gerade (Abb. 12). Den Estern A bis D müssen dagegen verzweigte Dicarbonsäuren zugrunde liegen. Diesen Befunden nach enthält ß-Lipomycin eine unverzweigte Kette mit mindestens acht C-Atomen. Die Carboxylgruppen der C_{10}-Dicarbonsäuren (Sebacinsäure) können schon von tertiären C-Atomen stammen. Weitere Aussagen über die Lipomycin-Seitenkette sollten die Verbindungen A bis D ermöglichen.

c Hinweise auf die Struktur der verzweigten Dicarbonsäuren aus den Massenspektren

Hinweise auf die Struktur der verzweigten Dicarbonsäuren liefern die Massenspektren von A – D. Da das Fragmentierungsschema der Ester sehr ähnlich ist, wird nur das Massenspektrum von A (Abb. 13) ausführlich diskutiert. Von den übrigen sind die für die Strukturermittlung wichtigen Schlüsselbruchstücke mit in Tab. 7 zusammengefaßt, ebenso die Daten der gradkettigen Dicarbonsäure-dimethylester.

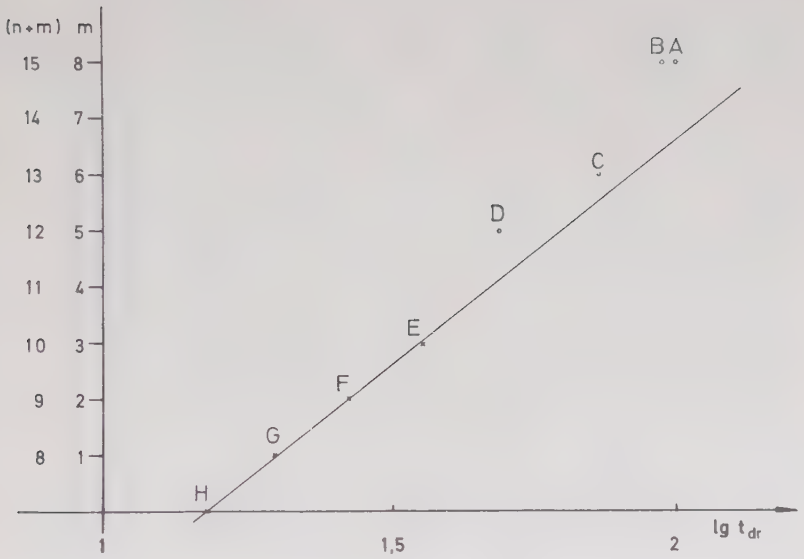


Abb. 12 : Vergleich der Retentionszeiten der Komponenten A — H

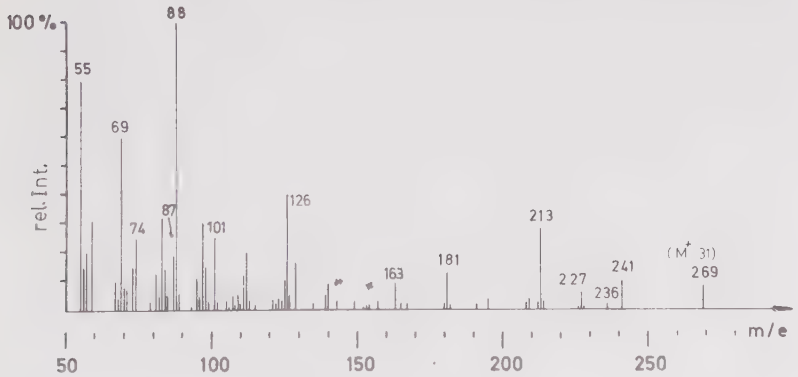


Abb. 13 : Massenspektrum des zu Peak A gehörenden Dicarbonsäure-dimethylesters

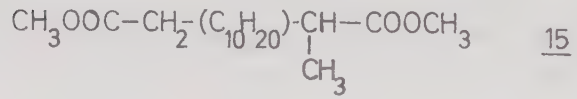
Tab. 7 : Schlüsselbruchstücke aus den Massenspektren der zu Peak A bis G (vgl. Abb. 11) gehörenden Substanzen

Peak im Gas-chromatogramm	$M^+ - 31$	$M^+ - 64$	Mol.-Gewicht	Summen-formel	McLafferty-Umlagerung	ß, γ-Um-lagerung	radikalische α, ß-Spaltung
A, B	269	236	300	$C_{17}H_{32}O_4$	88 (100%) 74 (25%)	101 87	213 (28%) [⟶ 181, 163 227 (8%) $m^* = 154, 147$]
C	241	208	272	$C_{15}H_{28}O_4$	74 (72%) 88 (44%)	87 101	199 (32%) [⟶ 167, 149 $m^* = 140, 130$]
D	227	194	258	$C_{14}H_{26}O_4$	88 (100%) 74 (25%)	101 87	171 (15%) [⟶ 139, 121 185 (10%) [⟶ 153]
E	199	166	230	$C_{12}H_{22}O_4$	74 (90%)	87	157 (36%) [⟶ 125, m^* = 109]
F	185	152	216	$C_{11}H_{20}O_4$	74 (100%)	87	143 (35%) [⟶ 111, m^* = [illegible]
G	171	138	202	$C_{10}H_{18}O_4$	74 (100%)	87	129 (35%) [⟶ 97, m^* = [illegible]

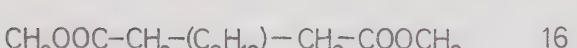
Wie erwähnt, geben Dicarbonsäure-dimethylester kein Molekül-Ion [32, 40]. Lediglich bei starken Vergrößerungen und niedrigen Energien in der Ionenquelle findet man entsprechende Spitzen. Für A wird das Mol.-Gew. (300) durch die Ionen bei m/e = 269 (M^+-OCH_3) und m/e = 236 (M^+ −64) angezeigt. Letzteres bildet sich durch zweimalige Eliminierung von Methanol aus dem Molekül-Ion, was nur bei Dicarbonsäure-dimethylestern möglich ist. Radikalbrüche am Molekül-Ion treten vornehmlich zwischen C-1 und C-2, bevorzugter aber noch zwischen C-2 und C-3 auf. Das Ion bei m/e = 241 entspricht also der Abspaltung eines Methoxycarbonylradikals ($\cdot COOCH_3$) und bei m/e = 227 (M^+−73) der von $\cdot CH_2$-$COOCH_3$. Die Spitze bei m/e = 213 läßt sich jedoch nur erklären, wenn man am α-C-Atom eine Methylverzweigung annimmt (Abspaltung von $\cdot CH(CH_3)COOCH_3$). Dafür, nämlich einem bevorzugten Radikalbruch am nunmehr tertiären C-Atom, spricht außerdem die hohe Intensität des 213-Signals (28% gegenüber 7% für m/e = 227 und 10% für m/e = 241). Durch aufeinanderfolgende Eliminierung von Methanol (−32) und Wasser (−18) entstehen aus m/e = 213 die Ionen bei m/e = 181 und 163. Diese Übergänge werden durch die metastabilen Peaks m^* = 154 und 147 bewiesen. Das Vorhandensein einer α-ständigen Methylgruppe wird durch die für Carbonylverbindungen typische McLafferty-Umlagerung bzw. ß,γ-Spaltung [43] bewiesen. Die zugehörigen Ionen liegen bei m/e = 88 (100%), 101 (25%), 74 (25%) und 87 (19%), entsprechend endständigen $-\underset{\underset{CH_3}{|}}{CH}-COOCH_3$ bzw. $-CH_2-COOCH_3$.

Aus den Massenspektren folgt, daß den zu den Peaks A, B und D gehörenden Dimethylestern α-methylverzweigte Dicarbonsäuren zugrundeliegen (C_{15} und C_{12}). Mit Sicherheit lassen sich für A/B bzw. D die Partialformeln 15 und 17 angeben und für C Formel 16. Das Massenspektrum von C enthält zwar auch einen m/e = 88 Peak

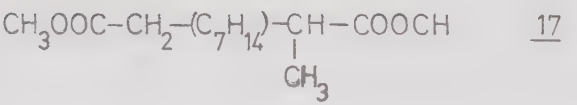
(charakteristisch für die α-Methylgruppe), der jedoch nur eine relative Intensität von 44% hat (gegenüber 100% in den Spektren von A, B und D). Vermutlich stammt diese Spitze von nicht ganz getrennten Verunreinigungen, zumal die im Kombinationsgerät verwendete Säule weniger gute Trenneigenschaften hatte.



15



16



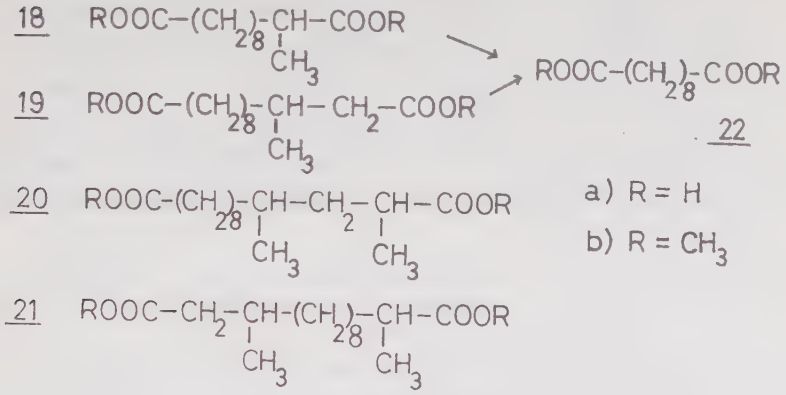
17

d. Beziehungen der Dicarbonsäuren zueinander

Geht man davon aus, daß die C_{15}-Dicarbonsäuren Primärprodukte der Oxidation sind und die niederen Dicarbonsäuren (deren Dimethylester Peak C bis H geben) aus ihnen durch Weiteroxidation vornehmlich an tertiären C-Atomen hervorgehen, so sollten die Strukturelemente der niedermolekularen Verbindungen in den C_{15}-Dicarbonsäuren enthalten sein. Dies führt dazu, daß für A/B neben der α-Methylgruppe eine weitere Methylverzweigung zu fordern ist, denn C (C_{13}-Dicarbonsäure-dimethylester), der Verbindung mit dem nächst kleineren Molekulargewicht, fehlt die α-Methylgruppe. Andererseits ist C aufgrund der Retentionszeit im Gaschromatogramm (Abb. 12) nicht gradkettig. E liegt die längste aufgefundene gradkettige Dicarbonsäure zugrunde (C_{10}-Sebacinsäure, 2), aus der verzweigten C_{13}-Dicarbonsäure (19a) entstehen, wenn diese

eine ß-Methylgruppe enthält (19a) aber auch aus der verzweigten C_{12}-Dicarbonsäure, wenn für sie 18a gilt. In beiden Fällen wird das tertiäre C-Atom zu einer der Carboxylgruppen der Sebacinsäure.

Aus 19a (= 3-Methyl-dodecan-dicarbonsäure) und der Partialformel 17 folgt, daß die C_{15}-Dicarbonsäuren eine weitere Methylverzweigung enthalten müssen, für deren Position in der Kette es zwei Möglichkeiten (20 und 21) gibt, sofern an einer unverzweigten Kette mit 8 CH_2-Gruppen (Bildung von Sebacinsäure) festgehalten wird.



e. Die Struktur der C_{15}-Dicarbonsäure

Es ist auffallend, daß bei der HNO_3-Oxidation des Decahydro-ß-lipomycins zwei C_{15}-Dicarbonsäuren entstehen, deren Dimethylester sich gaschromatographisch trennen lassen (Peak A und B in Abb. 11) und identische Massenspektren liefern. Dies kann zwei Gründe haben.

1) Die Abbausäuren haben gleiche Struktur (20 oder 21). Sie können jedoch aufgrund der sowohl in 20 als auch in 21 enthaltenen zwei Chiralitätszentren aus zwei Enantiomerenpaaren bestehen, deren einzelne Vertreter zueinander diastereomer und damit trennbar sind.

2) Die Abbausäuren sind strukturisomer und wahlweise 20 oder 21 zuzuordnen. Dies würde allerdings bedeuten, daß das eingesetzte ß-Lipomycin nicht einheitlich ist, sondern aus zwei bisher nicht getrennten Isomeren besteht.

Für die weitere Strukturermittlung war es notwendig, ausreichende Mengen der Dimethylester zu isolieren, um die NMR-Spektren zu messen. Durch präparative Gaschromatographie erhielt man alle verzweigten Dimethylester (Peak A bis D im Gaschromatogramm Abb. 11) in Mengen von ca. 5 – 8 mg. A und B waren zu 90% angereichert. C und D, denen die beiden methylverzweigten Dicarbonsäuren 19a und 18a zugrundeliegen, waren nach der Trennung einheitlich.

1) NMR-Spektren

Das 100 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von A (Abb. 14) zeigt an : Zwei Estermethoxyle (δ = 3,64 ppm, 6 H, S), α-CH und α-CH_2 (δ = 2,23 , 3 H, M), ß-CH_2 (δ = 1,4 – 1,9 , breit), aliphatische CH_2 (δ = 1,28, S), α-CH_3 (δ = 1,12, 3H, D mit J = 7 Hz), aliphatisches CH_3 (δ = 0,85 , 3H, D mit J = 7 Hz). Das NMR-Spektrum von B ist dem von A sehr ähnlich, lediglich das α-Methyl-Dublett ist etwas verschoben (1,14 ppm) und das Methylsignal bei 0,85 ppm läßt besser ein Dublett erkennen.

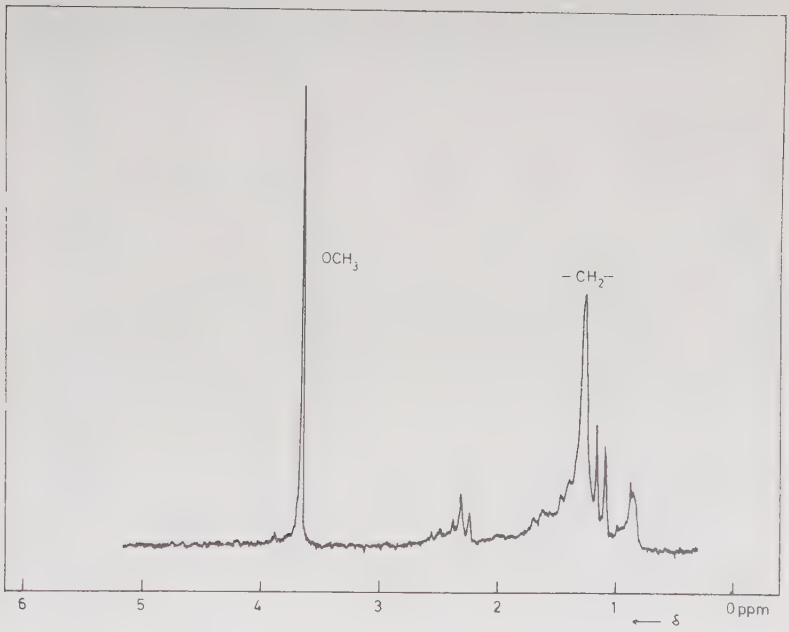


Abb. 14 : 100 MHz-NMR-Spektrum des zu Peak A gehörenden Dicarbonsäure-dimethylesters

Vergleicht man die Spektren von A und B mit denen von C und D (Tab. 8), so findet man im D-Spektrum ebenfalls ein α-CH_3-Dublett bei 1,13 ppm, während das zweite CH_3-Signal fehlt. Für D ist also die Strukturformel 18b bewiesen. Im Spektrum von C fehlt erwartungsgemäß das α-Methylsignal, die ß-Methylgruppe liegt bei 0,92 ppm und ist gegenüber dem 0,85 ppm-Methylsignal von A/B um 7 Hz paramagnetisch verschoben. Dies wird verständlich, wenn die Methylgruppe beim Übergang von A/B in C an die Estergruppe heranrückt. Da die Struktur von C (= 19b) festliegt, kann es sich in A/B nur um eine γ-Methylgruppe handeln. A/B

Tab. 8 : ^{1}H-NMR-Signale ($CDCl_3$) der zu den Peaks A bis D (Abb. 11) gehörenden Dicarbonsäure-dimethylester [x)]

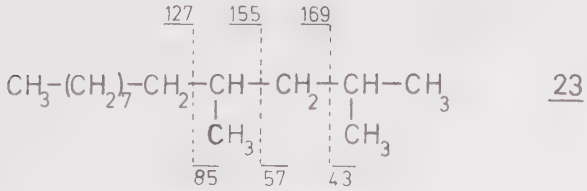
Strukturelement / Peak in Abb. 11	$COOCH_3$	α-CH, α-CH_2	ß-CH, ß-CH_2	CH_2-Kette	α-CH_3	ß-CH_3, γ-CH_3
A (14b)	3,65 (6, S)	2,32 (2, T : 7 Hz) 2,5 (M)	1,4-1,8 (4-6)	1,28 (6, S)	1,12 (3, D : 7 Hz)	0.85 (3, D : 7 Hz)
B (14b)	-//-	-//-	-//-	-//-	1,14 (3, D : 7 Hz)	-//-
C (13b)	-//-	2,32 (4, T : 6 Hz)	1,4-1,8 (4-5)	1,28 (12, S)	fehlt	0,92 (3, D : 6 Hz)
D (12b)	-//-	wie A und B	wie A und B	1,28 (10, S)	1,13 (3, D : 7 Hz)	fehlt

x) Chemische Verschiebungen in δ-Werten ; in Klammern : Intensität, Form des Signals (S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, M = Multiplett), Kopplungskonstante

sind also keine Strukturisomeren. Sie enthalten beide eine α und eine β-Methylverzweigung ; ihnen liegen stereoisomere 2,4-Dimethylpentadecandicarbonsäuren (20a) zugrunde.

2) Reduktion zum Alkan

Die Stellung der Methylgruppen in den C_{15}-Dicarbonsäuren ließ sich massenspektrometrisch durch das Fragmentierungsmuster des zugehörigen Alkans bestätigen. Die Methylester (20b) wurden mit $LiAlH_4$ in Tetrahydrofuran zu den Alkoholen reduziert, diese in die p-Toluolsulfonsäureester überführt, aus denen bei Behandlung mit $LiAlH_4$ in THF die Alkane hervorgingen. Die Reaktion verlief mit Palmitinsäure als Modellsubstanz in 40%iger Ausbeute. Da die Isolierung der C_{15}-Dicarbonsäuredimethylester durch präparative Gaschromatographie recht mühsam war, wurde das durch Oxidation des Decahydro-ß-lipomycin nach Veresterung erhaltene Gesamtgemisch der Dicarbonsäure-dimethylester eingesetzt. In 8%iger Ausbeute ließ sich ein farbloses Öl gewinnen und gaschromatographisch trennen (Abb. 15). Es liegt ein Alkangemisch mit einer Hauptkomponente vor (gegenüber zwei im Estergemisch). Ihr Massenspektrum (Abb. 16) zeigt, daß es sich dabei um den erwarteten Kohlenwasserstoff $C_{15}H_{32}$ (M^+ = 212) handelt. Aus dem Fragmentierungsschema folgt, daß 2,4-Dimethyltridecan vorliegt (23). Durch Radikalbrüche an tertiären C-Atomen entstehende Ionen treten mit vergleichsweise großer Häufigkeit auf und werden von einem um eine Massenzahl kleinerem Ion begleitet (Doppelspitzen).



23

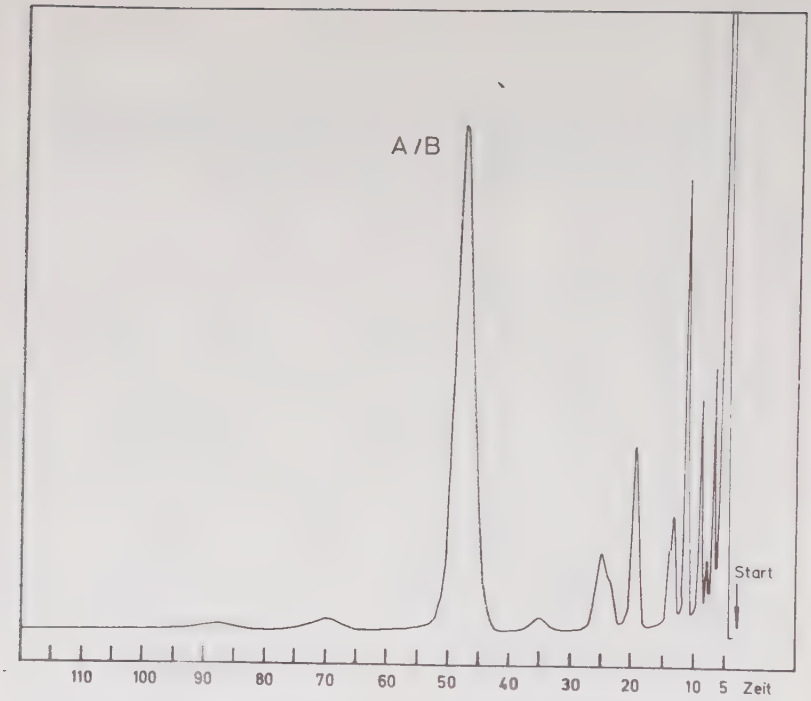


Abb. 15 : Gaschromatogramm des Alkangemischs

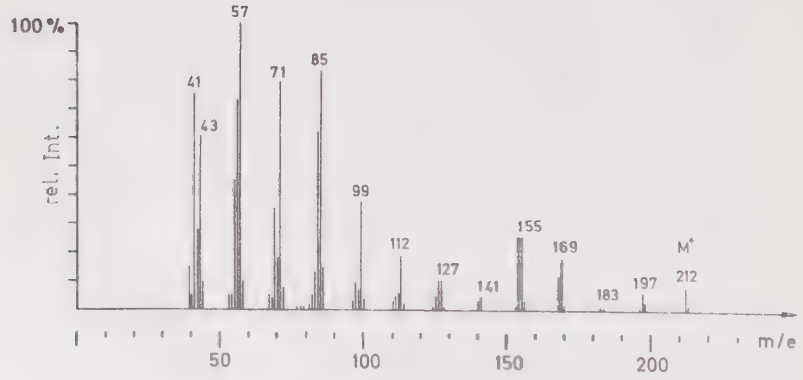


Abb. 16 : Massenspektrum der Hauptkomponente A/B des Alkangemischs

Damit ist gesichert, daß die C_{15}-Abbausäuren nach 20a zu formulieren sind. Daß im Gaschromatogramm der Methylester (Abb. 11) zwei Substanzen auftauchen, läßt sich auf das Vorliegen eines Diastereomeren-Gemisches zurückführen (s.u.). Bezeichnenderweise tritt im Gaschromatogramm des Alkangemisches nur ein Hauptpeak auf. Da 23 nur ein Asymmetriezentrum hat, sind lediglich Enantiomere zu erwarten, die sich in ihren Retentionszeiten nicht unterscheiden.

f. Erweiterung der ß-Lipomycin-Partialformel

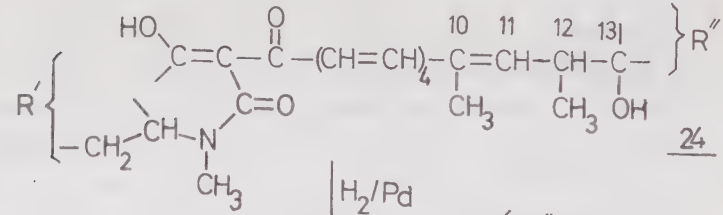
Da die C_{15}-Abbausäure 20a aus Decahydro-ß-lipomycin entsteht, sind Rückschlüsse auf die Struktur der ß-Lipomycin-Seitenkette möglich. Ausgehend von der Partialformel 14 darf man annehmen, daß die Ketogruppe (C-1) in eine der Carboxylgruppen von 20a übergeht. Dies kann jedoch nur die Carboxylgruppe auf der unverzweigten Seite der Dicarbonsäure sein, weil ß-Lipomycin dem ^{1}H-NMR-Spektrum nach neben 9 Olefin-H nur eine olefinische Methylgruppe enthält (δ = 1,83 ppm). Die Pentaenkette des ß-Lipomycins endet dann beim ß-C-Atom von 20a.

Damit ist:

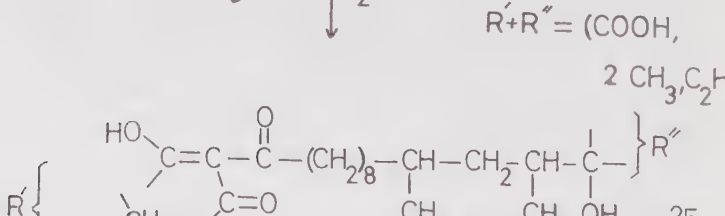
1) die Position der olefinischen Methylgruppe im Pentaen bestätigt und
2) gesichert, daß sich an das Pentaen eine $-\overset{|}{C}H-CH_3$-Gruppe anschließt, die auf der anderen Seite an einem C-Atom steht, das vor der Oxidation zu einer Carboxylgruppe gehörte oder aber leicht zu einer solchen oxidierbar ist.

Daß am Ende der ß-Lipomycin-Seitenkette keine Carboxylgruppe steht, folgt aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins. Das 3H-Dublett der aliphatischen Methylgruppe, die dann der

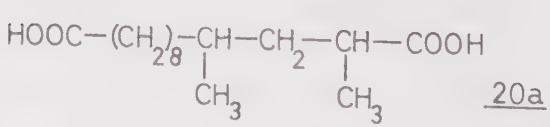
COOH-Gruppe benachbart wäre, liegt nicht zwischen 1,1 und 1,2 ppm wie im Abbau-säure-dimethylester (20b), sondern unter 1,0 ppm (zusammen mit den Signalen von zwei weiteren Methylgruppen um 0,85 – 0,95 ppm). Danach ist das in der Kette folgende C-Atom sp^3 hybridisiert. Die leichte Oxidierbarkeit wird erklärbar, wenn dieses C-Atom die noch fehlende Hydroxylgruppe trägt, die im α-Lipomycin mit dem Zuckerrest veräthert ist. Damit läßt sich die ß-Lipomycin-Partialformel 14 zu 24 erweitern.



24



25



20a

Aus 24 entsteht durch katalytische Hydrierung 25, dessen Oxidation 20a liefert. Je milder die Oxidation ausgeführt wurde, desto mehr 20a entstand ; je schärfer oxidiert wurde, desto höher war der Anteil der niederen Dicarbonsäuren, die aus 20a hervorgehen. Höhere Dicarbonsäuren wurden nicht nachgewiesen.

g. Optische Aktivität der C_{15}-Dicarbonsäuren

Da die zu den Peaks A und B (Abb. 11) gehörenden Dimethylester dieselbe Struktur haben (20b), bleibt als Erklärung für ihre unterschiedlichen Eigenschaften (dokumentiert durch verschiedene Retentionszeiten), daß optische Isomere vorliegen, was bei zwei Chiralitätszentren im Molekül denkbar ist. Damit im Einklang steht, daß A und B unterschiedliche optische Aktivität ($[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ bzw. $-7,7^\circ$) zeigen.

Aus Partialformel 24 für ß-Lipomycin folgt, daß das Chiralitätszentrum am α-C-Atom in 20a (= C-12 in 24) nativ ist, während das am γ-C-Atom (C-10 in 24) erst bei der Hydrierung entsteht. Bei nativen Chiralitätszentren in Naturstoffen kann man von einer optisch einheitlichen Konfiguration ausgehen (R oder S) (Daß dies auch für ß-Lipomycin gilt, beweist die Tatsache, daß A und B überhaupt Drehwerte zeigen.) Für das zweite neu entstandene Zentrum ist dagegen R und S Konfiguration zu erwarten. Folgende Isomere sind möglich :

	a	b	c	d
α-C-Atom	R	R	S	
γ-C-Atom	R	S	R	

So werden nach Hydrierung und Oxidation des ß-Lipomycins zwei optisch isomere 2,4-Dimethyltridecan-dicarbonsäuren (20a mit a/b- oder c/d-Konfiguration) entstehen, die zueinander diastereomer sind.

Diastereomere unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften (deshalb gelingt die Trennung der Dimethylester) und sie sollten verschiedene Drehwerte haben, was die Messungen bestätigen. Den gefundenen Drehwerten nach trägt das α-Zentrum ca. -8.8° zur Drehung bei, das γ-Zentrum ca. $\pm$ 1.1°.

Zu erklären bleibt, warum A in größerer Menge entsteht als B (Verhältnis 4 : 1). Da C-12 (und vermutlich auch C-13) in Partialformel 24 optisch einheitlich konfiguriert ist, verläuft die Hydrierung, die das Zentrum an C-10 in 25 liefert, in gewissem Umfang diastereoselektiv [44] und eines der beiden Diastereomeren entsteht im Überschuß. Dies bestätigt 19a, das aus 20a entsteht und nur das bei der Hydrierung entstandene Chiralitätszentrum enthält. Für seinen Dimethylester 13b (Peak C in Abb. 11) wird auch ein Drehwert gefunden ($[\alpha]_D^{20} = -1.5^{\circ}$), d.h. an C-10 in 24 wird bei der Hydrierung eine Konfiguration bevorzugt gebildet, andernfalls müßte 19a ein Racemat sein, und 13b dürfte keine Drehung zeigen. Die Drehung von C ist erwartungsgemäß schwach negativ, denn im A/B-Gemisch überwiegt das Diastereomere mit dem negativeren Drehwert. Was für 19a gilt, sollte auch für 18a gelten. Eine Überprüfung scheiterte daran, daß von 18b (Peak D in Abb. 11) nicht genügend Substanz verfügbar war, um eine Drehung sicher nachzuweisen.

Bei der Reduktion der diastereomeren C_{15}-Abbausäuren entsteht nur ein 2,4-Dimethyltridecan 23, denn bei der Reduktion geht das native Chiralitätszentrum in 20a verloren. Entsprechend der diastereoselektiven Hydrierung von 24 besteht 23 im Verhältnis 4 : 1 aus den optischen Antipoden, die sich gaschromatographisch nicht unterscheiden lassen. Für die Messung der optischen Drehung stand zuwenig Substanz zur Verfügung.

3. Chromsäure-Oxidation

Partialformel 24 für ß-Lipomycin zufolge ist an der Pentaenseitenkette noch ein Rest R" unbekannt, dessen Aufklärung durch oxidativen Abbau nur sinnvoll erschien, wenn sich aus Decahydro-ß-lipomycin ein Abbauprodukt mit mehr als 15 C-Atomen gewinnen ließ. Dazu wären Oxidationsbedingungen erforderlich, unter denen die Seitenkette des heterocyclischen Rings an der Ketogruppe abgespalten wird, in Nachbarstellung des Hydroxyls jedoch keine Kettenspaltung eintritt. Dies wurde durch milde Chromsäure-Oxidation erreicht. Größere Abbauprodukte sollten unter schärferen Oxidationsbedingungen in die schon bekannten Dicarbonsäuren 17a – 20a übergehen.

a. Reaktionsbedingungen und Trennung der Oxidationsprodukte

Decahydro-ß-lipomycin kochte man zunächst mit Lithiumalanat in THF 36 Stdn. am Rückfluß und oxidierte das Reaktionsprodukt bei 60° 120 Min. mit der 40fachen molaren Menge Chromsäure in Eisessig. Die mit Butanol extrahierbaren Abbausäuren wurden mit ätherischer Diazomethanlösung verestert und gaschromatographisch an Butandioladipat (BDA) getrennt (Abb. 17). Unter diesen Bedingungen erhielten Schlegel und Thrum [32] aus Flavomycoin eine aliphatische Dicarbonsäure (isoliert als Methylester). Deshalb erwartete ich für ß-Lipomycin zunächst nur die bekannte C_{15}-Dicarbonsäure 20a. Schon beim ersten Versuch zeigte ein Vergleich mit dem Methylestergemisch der HNO_3-Oxidation jedoch, daß zusätzlich vier Substanzen mit größerer Retentionszeit entstanden waren (Abb. 17 : I, II, III und IV ; A und B sind die schon bekannten diastereomeren C_{15}-Dicarbonsäure-dimethylester 20b)

Ihr Anteil ging zugunsten von A und B zurück, wenn man die Reaktionsbedingungen verschärfte.

Das Mengenverhältnis von I und II auf der einen und III und IV auf der anderen Seite ist von der der Oxidation vorangehenden $LiAlH_4$-Reduktion abhängig. Während bei 36-stündigem Kochen mit $LiAlH_4$ beide Substanzpaare in annähernd gleichen Mengen anfallen, werden III und IV fast gar nicht gebildet, wenn man nur zwei Stdn. reduziert. Zu optimalen Ausbeuten an I, II, III und IV kam ich als ich bei der Chromsäure-Oxidation die Temperatur von 60° auf 50° erniedrigte und die Reaktionsdauer von 120 auf 90 Min. verkürzte.

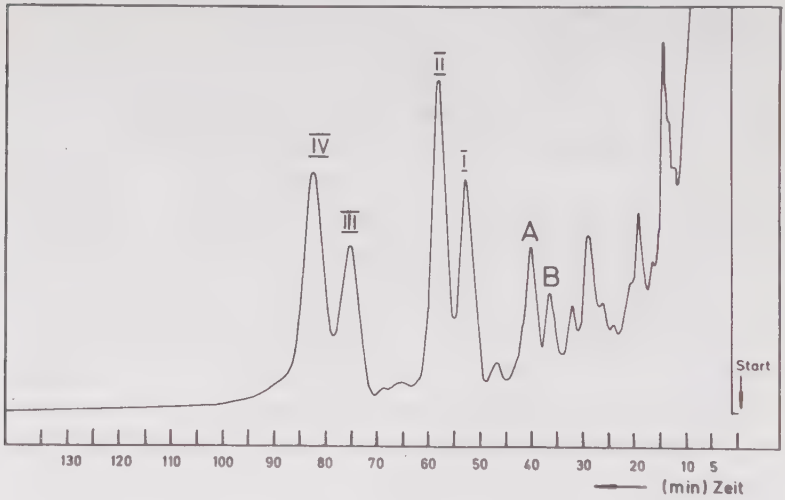


Abb. 17 : Gaschromatogramm des Methylestergemisches der Chromsäure-Oxidation

Von den zu den Peaks I bis IV gehörenden Estern wurden die Massenspektren mit Hilfe des GC/MS-Kombinationsgerätes aufgenommen. Die Esterpaare I/II und III/IV ließen sich durch

präparative Gaschromatographie trennen, für eine Trennung in die Einzelkomponenten stand zu wenig Substanz zur Verfügung, somit dienten die Esterpaare zur Aufnahme von ^{1}H-NMR-Spektren und IR-Spektren sowie zur Bestimmung der Summenformeln verschiedener Fragmente durch hochauflösende Massenspektroskopie.

b. Massenspektren

Die Massenspektren von I und II sowie III und IV sind jeweils identisch. Die Verbindungspaare unterscheiden sich im Molekulargewicht um 14 Masseneinheiten, haben aber ein analoges Fragmentierungsmuster. Die Ionen mit höchster Massenzahl (m/e = 312 bzw. 326) sind gradzahlig und sollten die Molekül-Ionen sein. Dann aber liegen keine Dicarbonsäure-dimethylester vor, bei denen das Ion mit höchster Massenzahl ungradzahlig ist ($M^+ - 31$). Die Summenformel $C_{19}H_{36}O_3$ für I/II wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie gesichert, für III/IV gilt $C_{20}H_{38}O_3$.

I/II sind Methylester einer Abbausäure mit 18 C-Atomen (drei mehr als die C_{15}-Dicarbonsäure 20a. III/IV liegt eine C_{19}-Abbausäure zugrunde. Neben der Carboxylgruppe ist ein weiteres Sauerstoffatom und ein Doppelbindungsäquivalent enthalten. Daß — auf diese Daten passend — eine Ketocarbonsäure entstanden ist, wird aus dem IR-Spektrum von I/II (Abb. 19 ; Bande bei 1736/cm für C=O-Ester und 1710/cm für C=O-Keton) und aus den Massenspektren deutlich. Da I/II und III/IV dasselbe Fragmentierungsmuster zeigen, wird nur das Massenspektrum von I (identisch mit dem von II) diskutiert (Abb. 18). Die Interpretation vereinfachte sich dadurch, daß die Summenformeln der wichtigsten Fragmente durch Hochauflösung gesichert sind.

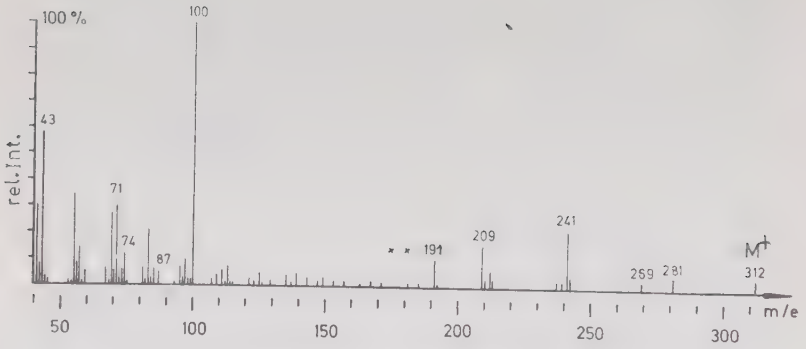
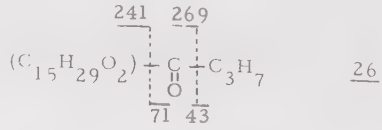


Abb. 18 : Massenspektrum des zu Peak I (Abb. 17) gehörenden Abbausäure-methylesters der Chromsäure-Oxidation

Die Ionen bei m/e = 281 (M^+-31) und 269 (M^+-43) entstehen durch Abspaltung von Methoxyl und C_3H_7 (Propyl oder Isopropyl) aus dem Molekül-Ion. Das Fragment m/e = 241 hat die Summenformel $C_{15}H_{29}O_2$ ($M^+-C_4H_7O$). Es enthält noch die Methoxycarbonylgruppe und verliert nacheinander Methanol und Wasser (Ionen bei m/e = 209 ($C_{14}H_{25}O$) und 191 ($C_{14}H_{23}$) mit metastabilen Peaks bei 181 und 171). Danach entsteht das 241-Ion bei einer für Ketone typischen α-Spaltung, d.h. auf einer Seite der Carbonylgruppe steht der C_3H_7-Rest, dessen Abspaltung zum Ion bei m/e = 269 führte. Da nach Bindungsbruch die positive Ladung auch an den kleineren Bruchstücken bleiben kann, findet man deutliche Spitzen für alle vier durch α-Spaltung entstandenen Bruchstücke (vergl. 26).



26

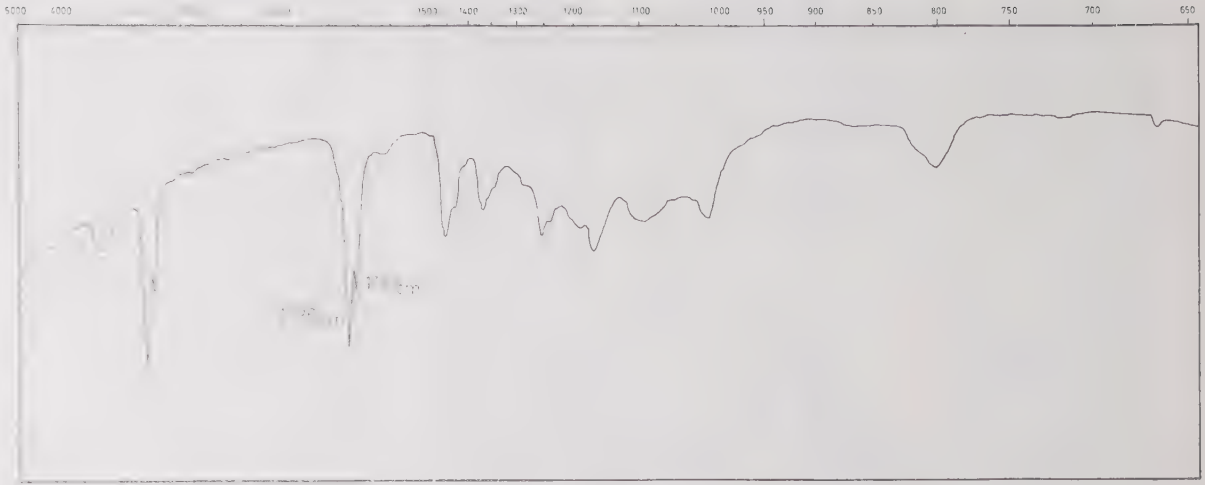
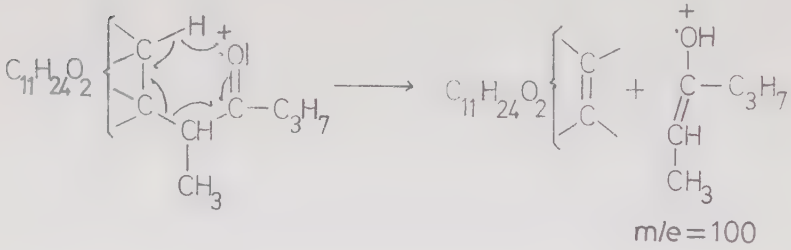
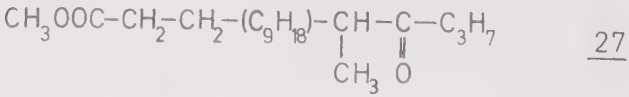


Abb. 19 : IR-Spektrum der Peak I und II (Abb. 17) entsprechenden diastereomeren Ketocarbonsäuremethylester.

Der Basispeak bei m/e = 100 hat die Summenformel $C_6H_{12}O$. Er entsteht bei der für Ketone eindeutig bevorzugten ß-Spaltung (McLafferty-Umlagerung). Da nicht m/e = 86, sondern 100 gefunden wird, muß sich am α-C-Atom der längeren Alkylkette eine Methylverzweigung befinden :



Fragmentierungen am Methoxycarbonylende der Ketocarbonsäureester sind weniger häufig. Die Ionen m/e = 74 und 87 (88 und 101 fehlen) zeigen an, daß α- und ß-C-Atom benachbart der Estergruppe keine Methylverzweigungen tragen. Zusammenfassend ergibt sich aus den Massenspektren für I/II Partialformel 27 .



27

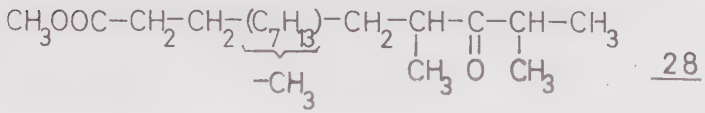
c. NMR-Spektren

Die NMR-Spektren der Ester I/II und III/IV sind sehr ähnlich. Wegen der geringen verfügbaren Substanzmenge waren deutliche Signale erst nach 30 CAT-Durchläufen erkennbar. Eine genaue Integrationskurve konnte nicht erhalten werden. Die Spektren (das in Abb.

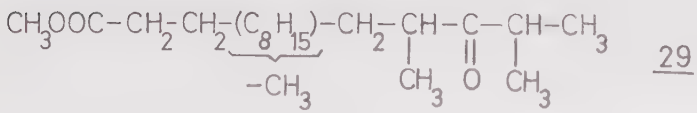
20 wurde von I/II erhalten) zeigen an :

δ = 3,67 ppm (3 H-Methoxylsingulett) ; 2,73 (2 H-Multiplett, tert. CH benachbart CO) ; 2,31 (2 H-Triplett, J = 6,5 Hz, CH_2 benachbart Methoxycarbonyl, durch ß-CH_2 aufgespalten) ; 1,65 (nicht aufgelöst ß-CH_2) ; 1,29 (nicht aufgelöst, reines Aliphat-CH_2); 1,10 (Dublett : J = 6 Hz, CH_3 an α-CH neben CO) ; 0,86 (Triplett, schlecht aufgelöst, Aliphat-CH_3) .

Die gefundenen Signale stehen mit Partialformel 28 in Einklang. Da das Dublett für α-Methylgruppen wesentlich intensiver ist als das Signal für reines Aliphat-CH_3 enthalten die Ketocarbonsäuren dem zwar ungenauen Integral nach mindestens zwei (eher drei α-CH_3) im Molekül. Als mögliche Positionen kommen nur die beiden Seiten der Carbonylgruppe in Frage, was bei mindestens zwei α-CH_3 bedeutet, daß der C_3H_7-Rest eine Isopropylgruppe ist. Um das 0,86-CH_3 zu erklären, muß in der Kette zwischen Keto- und Estergruppe eine weitere Methylverzweigung stehen, und zwar aufgrund der Lage des Signals mit Sicherheit nicht in ß-Stellung zu den funktionellen Gruppen. Zusammenfassend ergeben sich aus den spektroskopischen Daten Partialformel 28 für I/II und 29 für III/IV.



28



29

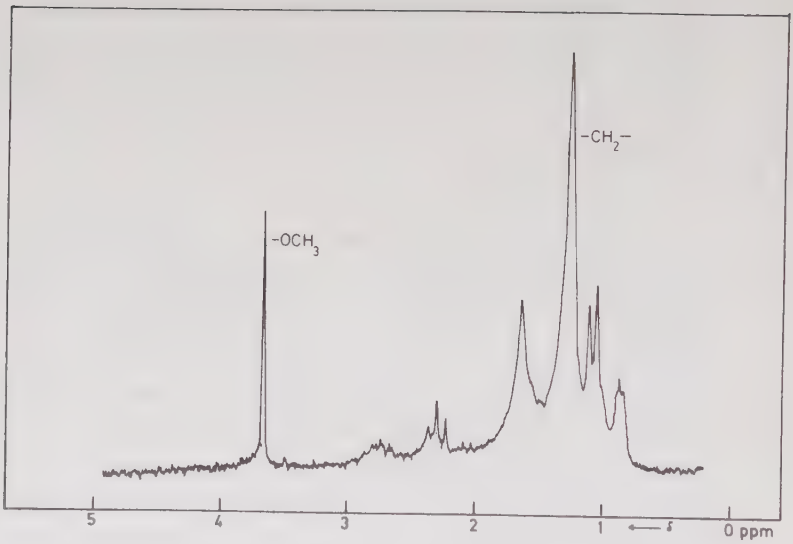
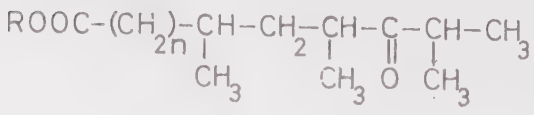


Abb. 20 : 100 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der Peak I/II entsprechenden Abbausäuremethylester ($CDCl_3$)

d. Struktur der Ketocarbonsäuren

Da unter schärferen Bedingungen auch bei der Chromsäure-Oxidation überwiegend die diastereomeren C_{15}-Dicarbonsäuren (20a) entstehen, die von der Salpetersäure-Oxidation her bekannt sind, muß 20a in 28 enthalten sein, was für die C_{18}-Ketocarbonsäure zur Struktur 30a (10,12,14-Trimethyl-13-oxo-pentadecancarbonsäure) führt.



30: n=8 a: R=H

31: n=9 b: R=CH_3

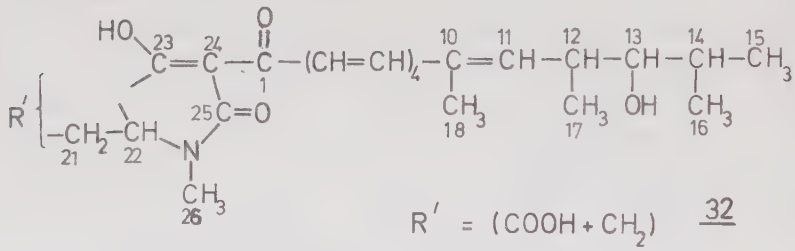
Die C_{19}-Ketocarbonsäure paßt zunächst nicht in dieses Schema, denn ihre Oxidation an der Ketogruppe führt zu einer C_{16}-Dicarbonsäure, die als Oxidationsprodukt aus Decahydro-ß-lipomycin bisher nicht nachgewiesen wurde. Es ist zu vermuten, daß $LiAlH_4$ im Decahydro-ß-lipomycin die Ketogruppe der Seitenkette partiell zur CH_2-Gruppe reduziert und bei der Oxidation dann das nächste, zum heterocyclischen Ring gehörende C-Atom zur Carboxylgruppe wird. Für diese Erklärung spricht, daß bei 2 stdg. statt vorher 36 stdg. Reduktion nur die C_{18}-Ketocarbonsäure entsteht. Die um CH_2 größere Verbindung hat demzufolge Struktur 31a . Die aus 31a zu erwartende C_{16}-Dicarbonsäure ist im Gaschromatogramm des Estergemisches aus Chromsäure-Oxidation bisher nicht nachgewiesen worden.

Die Tatsache, daß 30a und 31a im Gaschromatogramm ihrer Methylester (Abb. 17) jeweils zwei dicht beieinander liegende Peaks liefern (I/II und III/IV), muß analog wie bei der C_{15}-Dicarbonsäure 20a (s. o.) auf das Vorliegen von diastereomeren Ketocarbonsäuren zurückgeführt werden. Die unterschiedlichen Anteile der Diastereomeren sind durch die partiell diastereoselektive Hydrierung zu erklären. Da eine Trennung der Diastereomeren nicht erfolgte, lassen sich keine Drehwerte angeben.

e. Die Struktur der ß-Lipomycin-Seitenkette

Die Ketocarbonsäuren 30a und 31a liefern den Beweis dafür, daß in der Lipomycin-Seitenkette (Partialformel 26) an C-13 neben einer sek. OH-Gruppe eine Isopropylgruppe steht. Die OH-Gruppe wird unter den Bedingungen der Chromsäure-Oxidation zur Ketogruppe dehydriert. Die Spaltung der Kette an C-1 ist gegenüber einer Spaltung benachbart zur Ketogruppe offensichtlich bevorzugt. Nur so wurde es möglich, das ganze C-Atom-Gerüst der Lipomycin-Seiten-

kette in einem Abbauprodukt fassen. Partialformel 26 wird damit zu Partialformel 32 für ß-Lipomycin. Keine Angaben sind zunächst über die absolute Konfiguration der beiden Chiralitätszentren in der Seitenkette möglich. Die Doppelbindungen sind gemäß dem IR-Spektrum der Lipomycine (s. o.) sehr wahrscheinlich all-trans konfiguriert.



$R' = (COOH + CH_2)$ 32

4. ^{1}H-NMR-Spektren und Doppelresonanzversuche

Die Struktur der Pentaenseitenkette (Partialformel 32) wird durch das ^{1}H-NMR-Spektrum der Lipomycine (Abb. 2 und 3) und durch Doppelresonanzversuche bestätigt. Die im ß-Lipomycin nachgewiesene OH-Gruppe ist im α-Lipomycin mit D-Digitoxose ß-glykosidisch verbunden, denn die andere OH-Gruppe bedingt die Indikatoreigenschaften des Chromophors, die im Glykosid und Aglykon gleich sind.

Die Methylgruppen C-15, C-16 und C-17 verursachen im $CDCl_3$-Spektrum des ß-Lipomycins (Abb. 2) die Signalgruppe (9H) (Abb. 21, 1)

zwischen 0,90 und 1,04 ppm. Es handelt sich um drei Spitzen : δ = 0.90 ; 0,97 und 1,04 ppm im Verhältnis 16 : 32 : 21, die durch Überlagerung zweier Dubletts entstehen, δ = 1,005 ppm (3H, J = 7 Hz) und 0,935 ppm (6H, J = 7 Hz). Es ist anzunehmen, daß das Dublett bei niederem Feld (3H) der Methylgruppe an C-12 (C-17) und das bei höherem Feld (6H) den Methylgruppen an C-14 (C-15, C-16) zuzuordnen ist. Dieses Signal ändert seine Struktur deutlich im $CDCl_3$-Spektrum des α-Lipomycins (Abb. 21,4) und auch, wenn man ß-Lipomycin in anderen Lösungsmitteln wie C_6D_6 oder d_6-Aceton (Abb. 21, 2 u. 3) mißt. Man findet hier Signale mit 4 bzw. 5 Spitzen unterschiedlicher Intensität, die durch Überlagerung dreier Dubletts erklärt werden müssen (s. Tab. zu Abb. 21). Der Befund ist folgendermaßen zu deuten. Die Isopropyl-Methylgruppen sind wegen ihrer asymmetrischen Umgebung nicht äquivalent (C-12 und C-13 sind optisch einheitlich konfiguriert). Dies tritt bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel im NMR-Spektrum des ß-Lipomycins unterschiedlich deutlich hervor. Beim α-Lipomycin wird dieser Effekt größer, denn hier ist er im Gegensatz zum ß-Lipomycin schon im $CDCl_3$-Spektrum sichtbar. Dies ist ein Zeichen dafür, daß sich die Substituenten am Chiralitätszentrum C-13 verändert haben (ß-D-Digitoxosid gegenüber Hydroxyl).

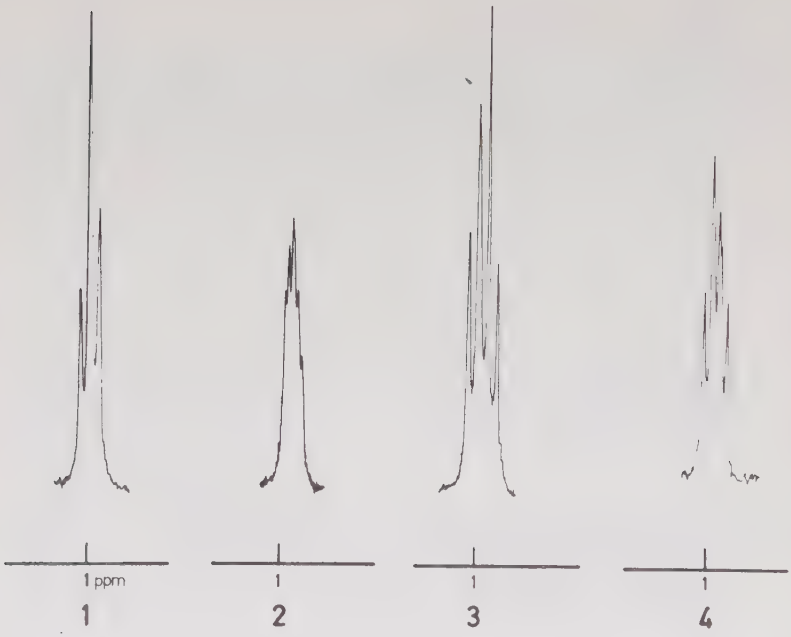


Abb. 21 : ^{1}H-NMR-Signalgruppen der aliphatischen Methyle
(α- und ß-Lipomycin in verschiedenen Lösungsmitteln)

1. ß-Lipomycin in $CDCl_3$

Einzelsignale : δ = 0, 90 ; 0, 97 ; 1, 04 ppm (16 : 32 : 21, 9 H)

gebildet durch : a) D : δ = 0, 935 ppm (6 H, 7 Hz), 0, 90 und 0, 97 ppm ;

b) D : δ = 1, 005 ppm (3 H, 7 Hz), 0, 97 und 1, 04 ppm

2. ß-Lipomycin in C_6D_6

Einzelsignale : δ = 0, 85 : 0, 88 ; 0, 92 ; 0, 94 ; 0, 97 ppm

gebildet durch : a) D : δ = 0, 885 ppm (7 Hz), 0, 85 und 0, 92 ppm ;

b) D : δ = 0, 91 ppm (6 Hz), 0, 88 und 0, 94 ppm ;

c) D : δ = 0, 945 ppm (5 Hz), 0, 92 und 0, 97 ppm

3. ß-Lipomycin in d_6-Aceton

Einzelsignale : δ = 0, 835 ; 0, 905 ; 0, 98 ; 1, 05 ppm
(10 : 18 : 18 : 10, 9 H)

gebildet durch: a) D : δ = 0, 87 ppm (7 Hz), 0. 835 und 0, 905 ppm,

b) D : δ = 0, 945 ppm (7, 5 Hz) ,
0, 905 und 0, 98 ppm,

c) D : δ = 1, 01 ppm (7 Hz), 0, 98 und 1, 05 ppm .

4. α-Lipomycin-methylester in $CDCl_3$

Einzelsignale : δ = 0, 86 ; 0, 91 ; 0, 93 ; 0, 98 ; 1, 03 ppm (9 H)

entstanden aus: a) D : δ = 0, 895 ppm (7 Hz), 0, 86 und 0, 93 ppm,

b) D : δ = 0, 945 ppm (7 Hz), 0, 91 und 0, 98 ppm,

c) D : δ = 1. 015 ppm (5 Hz), 0, 98 und 1, 03 ppm.

Durch Doppelresonanzversuche ließen sich die Signale der Protonen finden, die die Aufspaltung der C-Methylsignale bewirken. Strahlt man die Frequenz bei δ = 1, 72 ppm ein ($CDCl_3$-Spektrum von ß-Lipomycin , Abb. 2), so wird das Dublett δ = 0, 935 ppm (3 H, 7 Hz) zum Singulett. Das 1, 72 ppm Signal ist stark aufgespalten und wird zum Teil vom Singulett δ = 1, 83 ppm verdeckt. Es handelt sich also um das Methinproton an C-14, das mit den Methylgruppen C-15 und C-16 (7 Hz) und mit dem benachbarten Methinproton an C-13 koppelt.

12-H gibt einen unstrukturierten Signalhaufen bei δ = 2, 73 ppm, der auch im d_6-Aceton– und C_6D_6-Spektrum keine eindeutige Feinstruktur erkennen läßt. Wird seine Frequenz eingestrahlt, so ändern sich folgende Signale : Das Aliphatdublett (3 H, 7 Hz) δ = 1, 005 ppm wird zum Singulett, ebenso das Olefindublett bei δ = 5, 61 ppm (1 H, 10 Hz), das aber noch wegen geringer Kopplung mit dem Olefin-CH_3 (δ = 1, 83 ppm , 3 H, 1 Hz) verbreitert ist.

Daß 11-H (δ = 5, 61 ppm) und die olefinische C-Methylgruppe

(C-18, δ = 1,83 ppm) miteinander in Wechselwirkung stehen, zeigt das CH_3-Signal an, das etwas verbreitert und um ca. 15% kleiner ist als das N-Methylsignal (δ = 2,97 ppm). Durch Einstrahlen der Frequenz bei δ = 5,61 wird das 1,83-Signal höher und schärfer.

Versuche, das 13-H-Signal (Multiplett bei δ = 3,75 ppm) zu vereinfachen (Kopplung mit 12-H und 14-H sowie Hydroxyl-H) brachten aus apparativen Gründen kein Ergebnis. Es traten jedesmal in unmittelbarer Nähe des Signals gerätbedingte Störsignale auf.

Tab. 9 : ^{1}H-NMR-Doppelresonanzversuche beim ß-Lipomycin ($CDCl_3$)

Einstrahlung	Zuordnung	entkoppeltes Signal (ppm)	Vereinfachung	Zuordnung
1,72	14-H	0,935	D⟶S	15-CH_3, 16-CH_3
2,73	12-H	1,005	D⟶S	17-CH_3
		5,61	D⟶S	11-H
5,61	11-H	1,83	Intensitätsanstieg um ca. 15%	18-CH_3

B. Die Struktur des heterocyclischen Rings

Von der Partialstruktur 32 für ß-Lipomycin ausgehend, bleibt noch als letztes Problem die Ermittlung von R' und im Zusammenhang damit die Entscheidung, ob ein heterocyclischer Fünf- oder Sechsring vorliegt. Als Lösung bietet sich an, analog wie bei der Strukturermittlung der Tenuazonsäure (11)[37] oder des Erythroskyrins (12)[38] vorzugehen. In beiden Fällen spaltete man erst die enolische Doppelbindung im Fünfring durch Ozonolyse : das Hydroxyl-C-Atom wird dabei zur Carboxylgruppe. Nachfolgendes Kochen mit Säure hydrolysiert

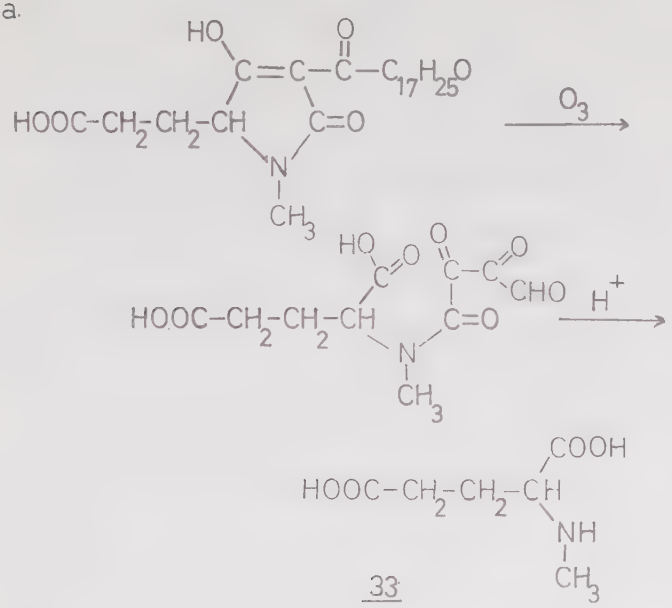
die Säureamidbindung und setzt eine Aminosäure frei. Erythroskyrin (12) liefert dabei L(+)-N-Methylvalin, aus Tenuazonsäure (11) entsteht L(-)-Leucin.

Für die Lipomycine sind zwei Möglichkeiten denkbar :

a) Liegt ein Fünfring vor, so hängt R' , bestehend aus CH_2- und COOH-Gruppe, an C-21, und man isoliert N-Methylglutaminsäure (33), aus deren spezifischer Drehung die absolute Konfiguration an C-22 abgeleitet werden kann.

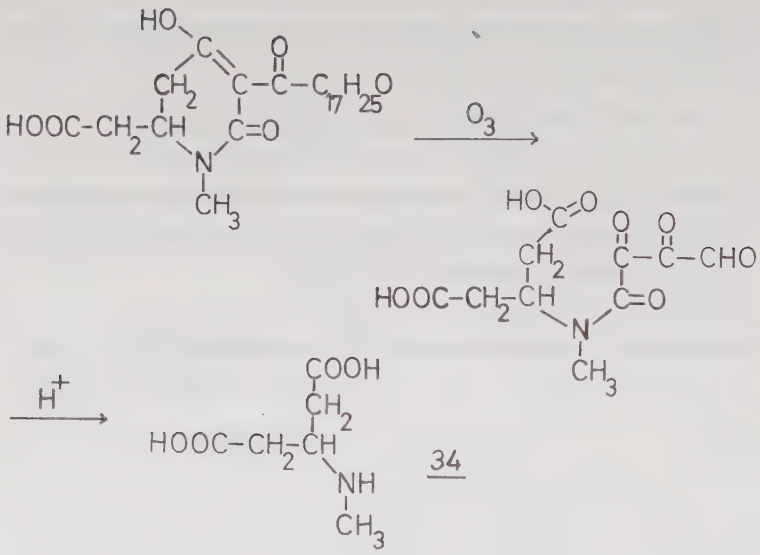
b) Liegt ein Sechsring vor, so entsteht die symmetrische und damit optisch inaktive N-Methylamino-ß-glutarsäure (34) ; auf die absolute Konfiguration von C-21 ergeben sich dann keine Hinweise.

a.



33

b.



34

1. Reaktionsbedingungen für den Ozonabbau und Aufarbeitung

Reaktionsprodukte

Für den Ozonabbau des Erythroskyrins [38] und der Tenuazonsäure[37] liegen nur unvollständige Versuchsbeschreibungen vor. Vor allem fehlen quantitative Angaben über den Ozongehalt des eingeleiteten Sauerstoffs. Als ich die beschriebenen Ozonisierungsbedingungen übertragen wollte, erhielt ich ninhydrinpositive Substanzen nur mit schlechter Ausbeute. Dies war nicht tragbar, da mir zu diesem Zeitpunkt meiner Arbeit nur noch wenig α- und ß-Lipoymcin zur Verfügung stand. Schließlich ozonisierte ich eine methanolische Lösung von 450 mg ß-Lipomycin, mit NH_3 auf pH = 8 eingestellt, bei -55° möglichst langsam, wobei ich den Verlauf der Reaktion

anhand des Elektronenspektrums (Verschwinden der langwelligen Absorptionsbande bei 395 mμ) verfolgte. Der Verdampfungsrückstand der Reaktionslösung wurde in 2 n HCl 8 Stdn. am Rückfluß gekocht. Danach ließen sich im Reaktionsgemisch ninhydrinpositive Substanzen nachweisen.

Eine Anreicherung der Substanz brachte die Chromatographie an Sephadex G-10. Einmalige Trennung führte zu einer Fraktion I, die einheitliche ninhydrinpositive Substanz enthielt, daneben jedoch nicht anfärbbare Verunreinigungen, die im Dünnschichtchromatogramm verhinderten, daß die Aminosäure nach Ansprühen eine scharfe Zone gab. Das 60 MHz-Spektrum zeigt ein auffallendes Signal bei δ = 2,78 ppm. Es ist als Amin-N-CH_3-Signal der zu erwartenden Amino-Abbausäure zu deuten. Gegenüber dem Amid-N-CH_3Signal im ß-Lipomycin (δ = 2,98 ppm) ist es deutlich zu höherem Feld verschoben. Seine Lage spricht allerdings mehr für N-Methylglutaminsäure (33). In N-Methyl-ß-amino-glutarsäure (34) sind die Carboxylgruppen von der N-CH_3-Gruppe soweit entfernt, daß sie kaum nennenswerten Einfluß auf die Verschiebung der N-Methylprotonen haben sollten. Für aliphatische N-Methyle findet man Signale unter δ = 2,5 ppm (N-Methyl-piperidin : $\delta_{N\text{-}CH_3}$ = 2,1 ppm). Für N-Methyl-ß-amino-glutarsäure (34) ist kein Signal bei δ = 2,78 zu erwarten. Undeutlich strukturierte Signalgruppen liegen um δ = 3,62 ; 2,65 und 2,30 ppm. Sie widersprechen weder N-Methyl-ß-amino-glutarsäure (34) (die α-CH_2-Gruppen könnten Signale bei δ = 2,30 ppm geben) noch N-Methyl-glutaminsäure (33) (Glutaminsäure z. B. gibt Signale bei δ = 2,55 (γ-CH_2), 2,15 (ß-CH_2) und 3,81 ppm (α-CH), sind aber auch kein Beweis für beide, da die Signale auch von Verunreinigungen stammen können, und zudem die Integrale auf keine Verbindung passen. Sicher ist eigentlich nur, daß eine Substanz mit einer N-CH_3-Gruppe vorliegt.

Nochmalige Trennung an Sephadex G-10 führte zu einer Fraktion II, die nur noch wenig Fremdsubstanz enthielt, so daß die genannten Störungen im Dünnschicht chromatogramm nicht mehr auftraten. Da weitere Reinigungsschritte wegen zu geringer Substanzmenge nicht sinnvoll waren, blieben zur Identifizierung :

a) Der Vergleich mit anderen Aminosäuren im Dünnschichtchromatogramm ;

b) Der Vergleich der Retentionszeit mit anderen Aminosäuren im Gaschromatogramm (N-Trifluoracetat-n-butylester) ;

c) Die Aufnahme eines Massenspektrums vom N-Trifluoracetylaminosäure-n-butylesters mit Hilfe des kombinierten Geräts GC/MS.

2. Dünnschicht- und Gaschromatographie

Die beiden in Frage kommenden Aminosäuren, N-Methyl-glutaminsäure (33) und N-Methyl-ß-aminoglutarsäure (34) standen als Vergleichssubstanz nicht zur Verfügung . Nur geringe Unterschiede zu N-Methyl-glutaminsäure (33) sollte Glutaminsäure selbst zeigen. Als Vergleichssubstanzen wurden ferner N-Methyl-valin und Valin gewählt, um die gaschromatographische Trennung auf ihre Leistungsfähigkeit hin zu kontrollieren.

Zur Chromatographie geeignet waren Cellulose-Dünnschichtplatten im System Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 :1) . Die gaschromatographische Trennung der Butylester-trifluoracetate erfolgte an Silicon-OV-1 bei verschiedenen Temperaturen (s. Tab. 10). Das Substanzpaar Valin/N-Methyl-valin zeigt ähnliche Unterschiede wie Glutaminsäure und die Abbau-Aminosäure. Die Abbau-Aminosäure hat einen größeren R_F-Wert und eine längere Retentionszeit

als Glutaminsäure, was auf eine zusätzliche Methylgruppe am Stickstoff zurückgeführt werden kann. Ob allerdings 33 oder 34 vorliegt, kann ohne authentische Vergleichssubstanz so nicht entschieden werden.

Tab. 10: R_F-Werte und Retentionszeiten

Substanz	R_F-Wert[1]	Retentionszeit[2] (Min.)
Abbau-Aminosäure aus ß-Lipomycin	0,32	32,2 [3]
Glutaminsäure	0,24	26 [3]
N-Methyl-valin	0,65	24 [4]
Valin	0,56	16 [4]

1) System Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1)

2) Substanz als N-Trifluoracetyl-n-butylester ; Säule : 4% Silicon OV-1 auf Chromosorb

3) Säulenofen : 155°

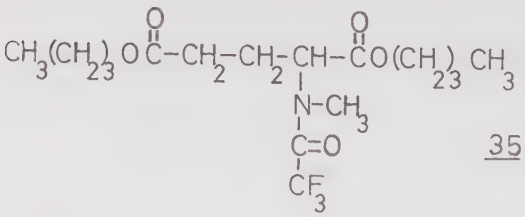
4) Säulenofen : 100°

3. Massenspektren

Zur Aufnahme der Massenspektren wurden ca. 5 mg der Abbau-Aminosäure aus Fraktion II bzw. ca. 3 mg Vergleichssubstanz (Glutaminsäure und Valin) mit methanolischer HCl in die Methylester überführt. Diese waren nun in Butanol löslich und ließen sich mit butanolischer HCl umestern. Anschließende Umsetzung mit Trifluoracetanhydrid in Methylenchlorid gab den entsprechenden N-Trifluoracetyl-n-butylester [45]. Die Massenspektren wurden nach

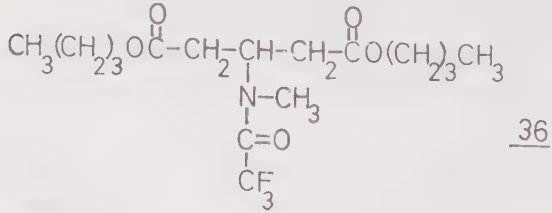
Trennung an Silicon-OV-17 im Kombinationsgerät GC/MS gemessen.

Die Massenspektren der Derivate von Glutaminsäure und der Abbau-Aminosäure (Abb. 22) zeigen ein identisches Fragmentierungsmuster, jedoch liegen die einzelnen Spitzen beim Abbausäurederivat durchweg um 14 Masseneinheiten höher. Das Ion höchster Massenzahl bei m/e = 369 (Abb. 22) ist das Molekül-Ion und steht mit dem für die Aminosäurederivate 35 und 36 zu erwartenden Werte im Einklang. Welches der beiden vorliegt, läßt sich nur mit Hilfe der genauen Interpretation des Massenspektrums entscheiden. Es geht also darum, das beobachtete Fragmentierungsmuster mit dem für 35 und 36 zu erwartenden zu vergleichen.



35

N-Trifluoracetyl-N-Methylglutaminsäure-di-n-butylester (35)

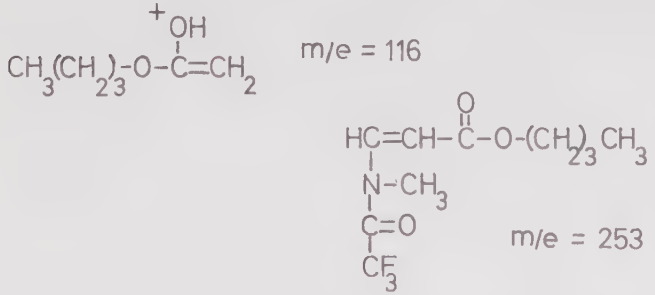


36

N-Trifluoracetyl-ß-aminoglutarsäure-di-n-butylester (36)

Bei N-Trifluoracetyl-α-aminosäureestern beobachtet man als bevorzugte Spaltung den Radikalbruch zwischen Carbonyl-C und α-CH-Gruppe, z. B. gibt N-Trifluoracetyl-valin-n-butylester den

Basispeak bei m/e = 168 ($M^+ - 101$). N-Trifluoracetyl-phosphinothricin-methylester [46] dagegen liefert den Basispeak bei m/e = 248 ($M^+ - 59$). Bei beiden finden sich keine Ionen, die auf eine Spaltung zwischen N-und α-CH-Gruppe hindeuten, ebenso bleibt die gesamte Trifluoracetamino-Gruppe unverändert. Für das Massenspektrum von N-Trifluoracetyl-glutaminsäure-di-n-butylester ist erwartungsgemäß die Abspaltung von Butoxycarbonyl typisch (A : m/e = 254, $M^+ - 101$). Aus A wird durch nachfolgende Reaktion an der verbliebenen Butylestergruppe B (m/e = 198, Verlust von Buten) und C (m/e = 180, Verlust von Butanol); der Basispeak des Spektrums liegt bei m/e = 152, entsprechend $M^+ - 203$. Ein analoges Fragmentierungsschema wäre auch für das N-Methyl-glutaminsäure-derivat (35) zu erwarten, während beim N-Trifluor-N-methyl-ß-aminoglutarsäure-di-n-butylester (36) die α, ß-Spaltung im Vordergrund stehen sollte, die durch den Substituenten am ß-C-Atom besonders begünstigt ist. Intensive Bruchstücke wären bei m/e = 116 und m/e = 253 zu erwarten :



Aus dem Ion bei m/e = 253 könnten noch Buten (gibt m/e = 197), Butanol (gibt m/e = 179) oder Butoxycarbonyl (gibt m/e = 152) abgespalten werden. Alle diese Ionen sind im Spektrum des Abbau-

Aminosäurederivats nicht enthalten. Das gefundene Fragmentierungsschema (Abb. 22) spricht deutlich für N-Trifluoracetyl-N-methyl-glutaminsäure-di-n-butylester (35).

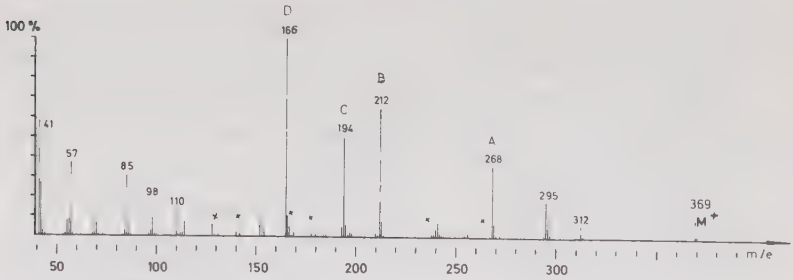
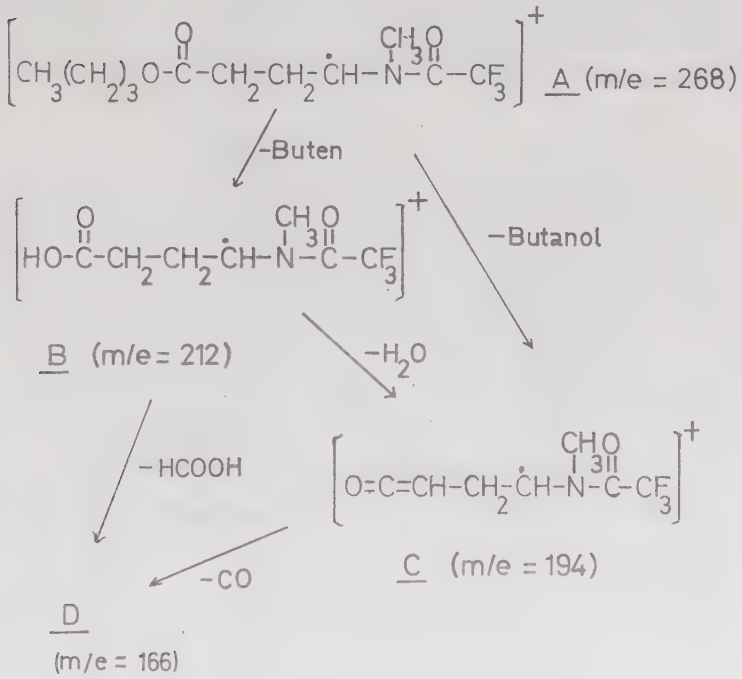


Abb. 22 : Massenspektrum des N-Trifluoracetyl-di-n-butylesters der Abbau-Aminosäure aus ß-Lipomycin

Aus dem Molekül-Ion bei m/e = 369 entstehen durch Abspaltung von Butyl ($M^+ - 57$; $m^* = 264$), Butoxyl ($M^+ - 73$; $m^* = 236$) und Eliminierung von Butanol ($M^+ - 74$; $m^* = 236$) die Ionen bei m/e = 312, 296 und 295. Bruchstück A (m/e = 268 ; $M^+ - 101$) ist eine Folge des Bindungsbruchs zwischen Carboxyl-C und α-CH-Gruppe. Da A noch eine Butoxycarbonylgruppe trägt, zerfällt es weiter in die Bruchstücke B und C und die Intensität von A beträgt nur 38% der des Basispeaks (Bruchstück D bei m/e = 166, $M^+ - 203$). Analoge Intensitätsverhältnisse findet man auch für die Ionen m/e = 254 und 152 des entsprechenden Derivats der Glutaminsäure, während beim N-Trifluoracetyl-valin-n-butylester die Abspaltung von Butoxycarbonyl ($M^+ - 101$ bei m/e = 168) mit größter Häufigkeit eintritt. Den Übergang von A nach B (m/e = 212, Abspaltung von Buten) zeigt $m^* = 167$ an. Eliminierung von Butanol aus A gibt C (m/e = 194, $m^* = 141$) ; ebenso

entsteht C aus B durch Abspaltung von Wasser (m^* = 178). Das Ion größter Häufigkeit D (m/e = 166) bildet sich aus B durch Eliminierung von Ameisensäure (B -46, m^* = 130) oder/ und aus C durch CO-Abspaltung (m^* = 142).



Das Fragmentierungsmuster des N-Trifluoracetyl-di-n-butyl-esters der Abbau-Aminosäure beweist, daß nach Ozonisierung und Säurespaltung N-Methyl-glutaminsäure (33) entstanden ist. Der

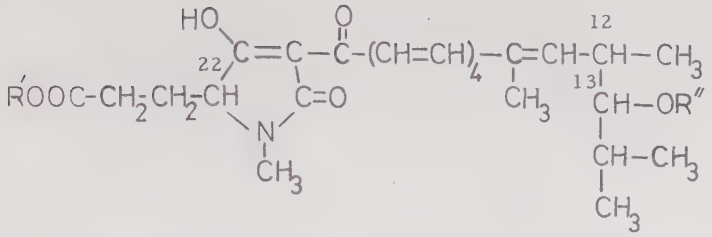
heterocyclische Ring ist somit als Fünfring zu formulieren. Natürlich steht noch aus, die N-Methylglutaminsäure (33) in größerer Menge rein abzutrennen, zumal über die spezifische Drehung die absolute Konfiguration an C-22 aufgeklärt werden kann. Für einen Ozonabbau mit größerer Substanzmenge stand mir kein Antibiotikum mehr zur Verfügung, so daß dieser Abbau im Rahmen einer anderen Arbeit durchgeführt werden muß, sobald ausreichende Mengen Lipomycin-Rohprodukt verfügbar sind.

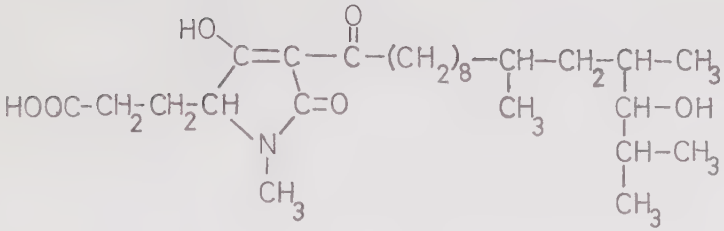
4. Die Struktur der Lipomycine

Die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen und identifizierten Abbauprodukte des ß-Lipomycins ermöglichen es für ß-und α-Lipomycin die Struktur anzugeben (37a und 37b), entsprechend gelten für die Methylester 37c und 37d und für Decahydro-ß-Lipomycin 38. Ungeklärt ist die absolute Konfiguration der drei Chiralitätszentren (C-12, C-13 und C-22), und ob die Doppelbindungen, wie aufgrund der IR- und UV-Daten anzunehmen ist, all-trans konfiguriert sind. Ferner lassen sich für das Triketosystem am heterocyclischen Fünfring mehrere Tautomere formulieren. (39 bis 44), von denen bisher nur 39 in allen Formeln, auch in der Literatur[37,38,47] auftaucht. Es schließt jedoch nicht aus, daß in Lösung auch andere Formen am Gleichgewicht beteiligt sind. Auffällig ist, daß die in 40 enthaltene OH-Gruppe, die von mit Carbonsäuren vergleichbarer Acidität ist, im NMR-Spektrum kein Signal gibt. Den Lipomycinen soll vorläufig 40 zugrunde gelegt werden. Es wäre jedoch lohnend, den Eigenschaften des Triketosystems im Rahmen einer anderen Arbeit weiter nachzugehen. Bei den Lipomycinen wäre zu klären, ob sich bei der Methylierung oder Acetylierung Isomere isolieren lassen.

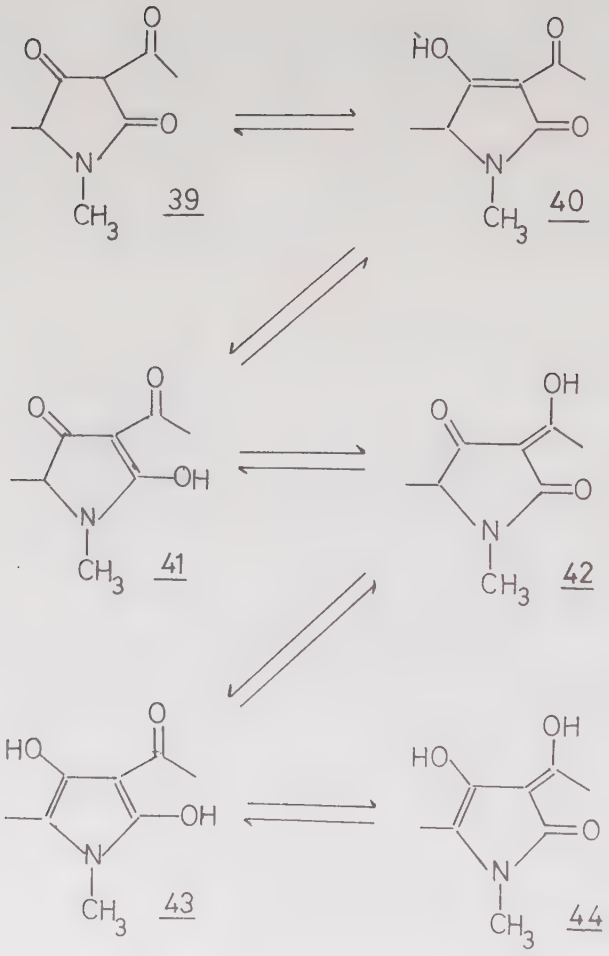
	R'	R''
a	H	H
b	H	D-Digitoxose (ß-glykosidisch)
c	CH_3	H
d	CH_3	D-Digitoxose (ß-glykosidisch)

37





38 Decahydro-ß-lipomycin

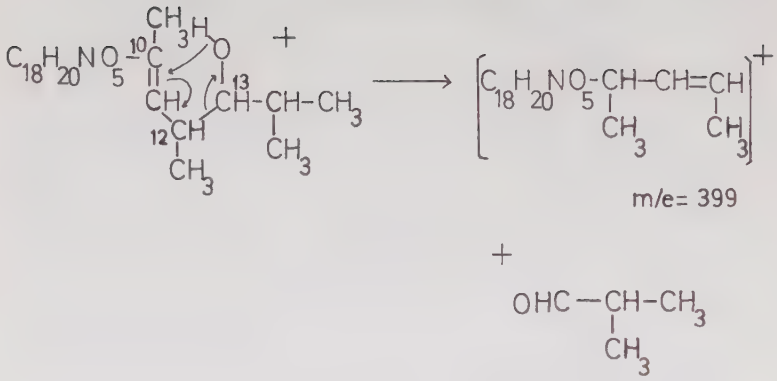

O
O
O
N
CH3
39
HO
O
O
N
CH3
40
O
O
OH
N
CH3
41
OH
O
O
N
CH3
42
O
HO
OH
N
CH3
43
OH
HO
O
N
CH3
44

6. Nachträgliche Interpretation spektroskopischer Befunde

Bisher wurde nicht näher auf das Massenspektrum des ß-Lipomycin-methylesters (37c) und das PFT-^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins (37a) eingegangen. Wie in Kap. IV erwähnt, war eine eindeutige Interpretation ohne Kenntnis der Strukturformel nicht möglich, deshalb konnten diese Spektren wenig zur Strukturermittlung der Lipomycine beitragen. Sie sollten nicht im Widerspruch zu den durch chemischen Abbau bewiesenen Strukturformeln stehen.

A. Das Massenspektrum des ß-Lipomycin-methylesters

Bei Temperaturen oberhalb von 170° läßt sich ß-Lipomycin-methylester (37c) im Hochvakuum verdampfen. Das Massenspektrum (Abb. 23) zeigt im oberen Massenbereich bei m/e = 471 das Molekül-Ion, dem die Summenformel $C_{27}H_{37}NO_6$ (Hochauflösung) zukommt. Ebenfalls durch Hochauflösung bestimmt wurde die Summenformel $C_{23}H_{29}NO_5$ des Ions bei m/e = 399. Es entsteht aus dem Molekül-Ion durch Abspaltung von C_4H_8O, was möglich ist, wenn die OH-Gruppe an C-13 im Zuge eines sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustands ihr Wasserstoffatom auf C-10 überträgt und sich die Bindung zwischen C-12 und C-13 löst.



Eine für Alkohole typische α-Spaltung (Verlust von $HO^{+}=CH-C_3H_7$) findet nicht statt. Im Molekül-Ion befindet sich die positive Ladung am heterocyclischen Fünfring und nicht am Hydroxyl-Sauerstoff, was für diese Spaltung Voraussetzung wäre.

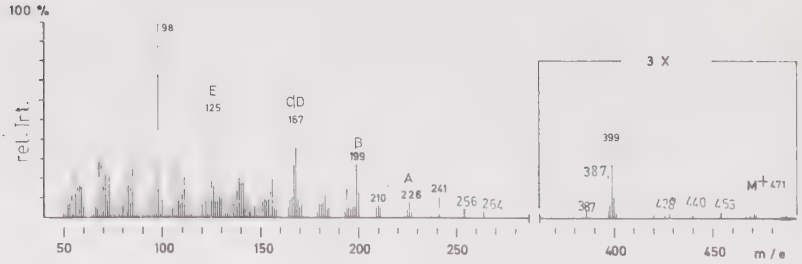
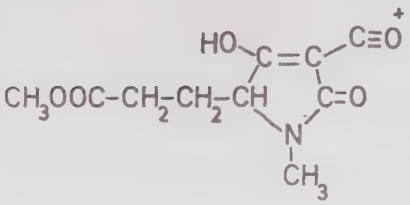


Abb. 23 : Massenspektrum des ß-Lipomycin-methylesters

Weitere Ionen im höheren Massenbereich findet man bei m/e = 453, 440, 428, 333, 307, 246, 256, 241, 226 und 210, 453, 440 und 428 entstehen aus dem Molekül-Ion unter Verlust von Wasser (-18), Methanol (-32) bzw. Isopropyl (-43). 397 (M^+-74) bildet sich durch α, ß-Spaltung zwischen C-20 und C-21, wobei die Ladung wiederum am größeren Bruchstück verbleibt. Über die übrigen Ionen lassen sich keine sicheren Aussagen machen, zumal sie nur mit geringer Häufigkeit auftreten. Von Bedeutung dagegen ist der Bindungsbruch benachbart zum Carbonyl-Kohlenstoff C-1. Das Ion bei m/e = 226 ließe sich so nach A formulieren.

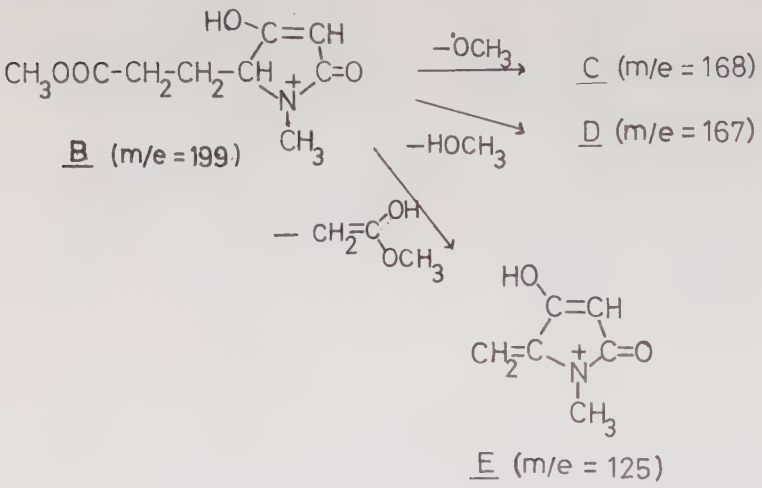


A: m/e = 226

Im unteren Massenbereich nimmt das Ion B (m/e = 199) eine Schlüsselstellung ein. Es entsteht durch Radikalbruch zwischen C-22 und C-1. Dabei übernimmt der heterocyclische Fünfring von der Pentaenkette ein H-Atom.

Von B lassen sich die Ionen C/D (m/e = 168/167) und E (m/e = 125) herleiten. Radikalische Abspaltung von Methoxyl (B - 31) bzw. Eliminierung von Methanol (B -32) geben C und D. Im Zuge einer α, ß-Spaltung verliert B CH_2 C $\begin{matrix} OH \\ OCH_3 \end{matrix}$ (B - 74). Ein Peak bei m/e = 74 tritt nicht auf, da die

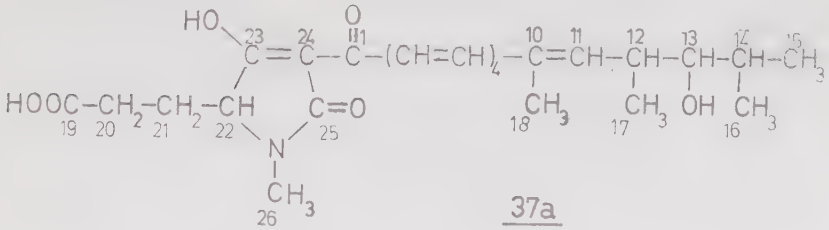
positive Ladung am größeren Bruchstück verbleibt. Es entsteht lediglich das Ion E (m/e = 125).



Das Massenspektrum des ß-Lipomycin-methylesters steht im Einklang mit der Strukturformel 37c .

B. Interpretation des PFT-^{13}C-NMR-Spektrum von ß-Lipomycin (37a) (Abb. 4)

In Tab. 11 sind die ^{13}C-NMR-Signale des ß-Lipomycins mit ihren δ-Werten (feldabwärts bezogen auf TMS, $\delta_{TMS} = 0$) und den aus den "off-resonance"-Teilentkopplungsversuchen erhaltenen Informationen zusammengestellt. Neben der Gruppenzuordnung wird eine Zuordnung der Signale zu einzelnen C-Atomen des ß-Lipomycins (siehe Formel 37a) versucht. In den Fällen, wo die Signale dicht zusammen liegen, ließ sich auch mit Hilfe der in der Literatur aufgegebenen Daten keine eindeutige Entscheidung treffen.

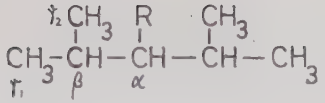


37a

Es wurde in einigen Fällen der Umweg beschritten, die ungefähre Lage der ^{13}C-Signale des ß-Lipomycins mit Hilfe bekannter Beziehungen und Modellverbindungen zu berechnen. Als Modell für den aliphatischen Teil der Lipomycin-Seitenkette wurde der Kohlenwasserstoff 45a mit dem Alkohol 45b verglichen, da die ^{13}C-δ-Werte für 45a bekannt sind [48].

Tab. 11 : ^{13}C-NMR-Signale des ß-Lipomycins (37a) und ihre Zuordnung

Signal Nr. (s. Abb. 4)	Kanal-zahl	ppm	δ_{TMS}(ppm)	Kopplungs-schema	vorgeschlagene Zuordnung
Aliphaten-Bereich					
1	1902	213,7	12,7		C-17
2	1863	208,5	16,9		C-15 od. C-16
3a (3b)	1855(1850)	207,6	17,8		C-18
4	1831	205,4	20,0		C-16 od. C-15
5	1797	201,4	24,0		C-21
6a (6b)	1771(1767)	198,6	26,8		C-26
	1758	197,3	28,1		Cyclohexan
7	1731	194,1	31,3	D ?	C-14
8	1679	188,8	36,6	D	C-12
Zwischen-bereich					
9	1478	167,3	58,1	T	C-20
10	1412	160,2	65,2	D	C-22
	1301	150,9	77,2	D	Chloroform
11	1269	148,2	80,7	D	C-13
Olefin-bereich					
12	1091	125,7	99,2	S	C-24
13	901	105,5	119,9	D	C-11
14	843	99,1	126,3		
15	808	95,35	130,0		
16	800	94,38	131,0		
17	767	91,06	134,4	S	C-10
18	737	87,7	137,4		
19a (19b)	720 (723)	85,87	139,6		
20	704	83,96	141,4		
21	684	81,72	143,7		
22	673	81,20	144,2		
Carbonyl-bereich					
23	412	53,72	171,7	S	C-23
24a (24b)	406 (403)	53,0	172,4	S	C-25
25	384	49,82	175,6	S	C-19
26	320	32,21	193,2	S	C-1



45a: R = CH_3

45b: R = OH

Durch Ersatz von CH_3 in 45a durch OH verschieben sich die δ-Werte der benachbarten C-Atome gemäß folgender Beziehungen[49]:

$$\delta^{ROH}_{C\text{-}\alpha} = 43,3 + 0,83\ \delta^{RCH_3}_{C\text{-}\alpha}$$

$$\delta^{ROH}_{C\text{-}\beta} = \delta^{RCH_3}_{C\text{-}\beta} + 0,5$$

$$\delta^{ROH}_{C\text{-}\gamma} = \delta^{RCH_3}_{C\text{-}\gamma} - 1,7$$

und man erhält (δ-Werte in ppm):

	45a (gef.)[48]	45b (ber.)[49]	45b (gef.)[50]	ß-Lipomycin (gef.)
C-α	45,3	80,9	80,6	80,7 (C-13, Sign. 11)
C-ß	29,8	30,3	--	31,3 (C-14, Sign. 7)
$C\text{-}\gamma_1$	21,4	19,7	--	20,0 (C-15 od. C-16,
$C\text{-}\gamma_2$	18,1	16,4	--	16,9 Sign. 4 u. 2)

Daß $C\text{-}\gamma_1$ und $C\text{-}\gamma_2$ nicht äquivalent sind, beruht darauf, daß trotz freier Drehbarkeit um die C-ß-C-α-Achse immer eins von ihnen sich in anderer chemischer Umgebung befindet als das andere (Δ = 3,1 ppm). Dazu muß, wie die Daten von 45a beweisen, C-α nicht notwendig chiral sein. (C-α muß von C-ß aus gesehen lediglich drei verschiedene Substituenten haben, von denen einer auch eine Isopropylgruppe sein darf). Beobachtet hat man diesen Effekt vor-

nehmlich an asymmetrischen Isopropyl-Alkyl-Carbinolen (als solchen kann man auch ß-Lipomycin auffassen) und fand in Extremfällen Unterschiede bis zu 6, 9 ppm in der chemischen Verschiebung der beiden Methylgruppen [51].

Für die Methylgruppe an C-10 (C-18) kann man eine Modellverbindung wie trans-3-Methyl-2-hexen zum Vergleich heranziehen [52]. Die olefinische Methylgruppe hat hier ein Signal bei δ = 15. 3 ppm, was am ehesten mit Signal 3 (δ = 17. 8 ppm) übereinstimmt.
(Signal 2 (δ = 16, 9 ppm) ist schon für eine Methylgruppe an C-14 vergeben) .

Bei den anderen Signalen im Aliphatbereich war die Zuordnung mit Modellverbindungen nicht so eindeutig. In einigen Fällen sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Unter Berücksichtigung der Teilentkopplungsergebnisse halte ich die angegebene Zuordnung für sinnvoll.

C-17 als aliphatische Methylgruppe dürfte ein Signal bei hohem Feld geben. Möglich ist nur Signal 1 (δ = 12, 7 ppm) , das nach Teilentkopplung in mehr als zwei Linien (wahrscheinlich zu einem Quadruplett) aufgespalten wird. C-12 ist vergleichbar mit C-14 (δ = 31, 4 ppm) . Ob sein Signal zu höherem oder tieferem Feld verschoben ist kann man nicht voraussagen. Am ehesten paßt Signal 8 (δ = 36, 6 ppm), das nach Teilentkopplung ein für eine Methingruppe erforderliches Dublett gibt. Es verbleiben im Aliphatbereich noch die Signale 5, 6, 9 und 10, die auf C-20, C-21, C-22 und C-26 verteilt werden müssen. Da 10 (δ = 65, 2 ppm) nach Teilentkopplung zum Dublett wird, muß ihm C-22 zugeordnet werden. 9 (δ = 58, 1 ppm) gibt ein Triplett und entspricht C-22, obwohl ein Signal bei höherem Feld zu erwarten wäre. (z. B. das α-C-Atom [52] von Buttersäure hat ein Signal bei δ = 36, 0 ppm.)

Die Signale 5 (δ = 24, 0 ppm) und 6 (δ = 26, 8 ppm) sind C-22 und C-26 ($N-CH_3$-Gruppe) zuzuordnen. C-22, entsprechend einem ß-C-Atom in einer aliphatischen Carbonsäure, paßt auf 5, z. B. geben die entsprechenden C-Atome in Buttersäure und Valeriansäure[53]) Signale bei 17, 4 ppm und 26, 9 ppm. Für $N-CH_3$ findet man meistens Signale über δ = 30 ppm. In 1, 2-Dimethylindol[54]) allerdings liegt das $N-CH_3$ bei δ = 28, 7 ppm, so daß Signal 6 passen würde.

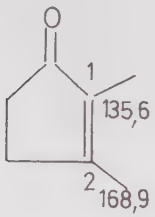
Alle Signale im Olefinbereich zuzuordnen, ist wenig aussichtsreich. Lediglich Signal 17 (δ = 134, 4 ppm), das nach Teilentkopplung ein Singulett bleibt, gehört offenbar zu C-10. Signal 13 (δ = 119, 9 ppm, Dublett nach Teilentkopplung) ist von allen Signalen der olefinischen Methingruppen am weitesten zu höherem Feld verschoben. Für diese Lage kommt C-11 am alkylsubstituierten Ende der Pentaenkette in Frage. Auf Signal 12 wird im Zusammenhang mit den Signalen im Carbonylbereich eingegangen.

Das Signal 26 (δ = 193, 3 ppm) im Carbonylbereich entspricht C-1. Es liegt außerhalb des Bereichs aliphatischer Ketone, da ungesättigte Substituenten eine Verschiebung zu höherem Feld bewirken. Im α, ß, α', ß' ungesättigten Diisopropylenketon[55]) liegt das Carbonylsignal bei δ = 188, 8 ppm. Übertragen auf C-1 im ß-Lipomycin wäre die geringe Abweichung von 4, 4 ppm zu niederem Feld darauf zurückzuführen, daß der abschirmende Effekt einer Doppelbindung durch die weitere konjugierte Carbonylgruppe (C-25) etwas vermindert wird.

C-19 läßt sich mit dem Carbonylsauerstoff in Buttersäure (δ = 179, 5 ppm) oder Valeriansäure (δ = 179, 6 ppm)[53b]) vergleichen. Am ehesten paßt Signal 25 (δ = 175, 6 ppm). Für die Abweichung habe ich keine plausible Erklärung gefunden.

Es verbleiben noch die Signale 12, 23 und 24, die ebenfalls von C-Atomen stammen, die keine Protonen tragen. Eins von ihnen (entweder 23 oder 24) stammt vom Säureamid-C-Atom (C-25). Eine Entscheidung ist nicht möglich ; zur Vereinfachung sei angenommen, daß es 24 (δ = 172, 4 ppm) ist.

23 (δ = 171, 7 ppm) und 12 (δ = 99, 7 ppm) gehören zu C-23 und C-24 der Enol-Doppelbindung. Eine andere Möglichkeit besteht nicht. Betrachtet man nun die spektroskopischen Daten α, ß-ungesättigter Ketone, z. B. von 2, 3-Dimethylcyclopenten (2)-1-on (46) [56], so findet man tatsächlich große Unterschiede zwischen den beiden C-Atomen 1 und 2.



46

Man erklärt dies mit Hilfe folgender Resonanzvorstellung :

Durch den negativen mesomeren Effekt der Carbonylgruppe wird die Elektronendichte um C-1 erhöht und um C-2 vermindert, was sich in einer Verschiebung zu höherem (C-1) bzw. niederem Feld (C-2) bemerkbar macht. Eine zusätzliche konjugierte Carbonylgruppe (wie im Lipomycin) dürfte diesen Effekt noch verstärken, außerdem

trägt C-23 noch die elektronenziehende Hydroxylgruppe. Auf diese Weise wird die relativ extreme Verschiebung der Signale von C-23 (Signal 23, δ = 171,7 ppm) und C-24 (Signal 12, δ = 99,7 ppm) im ß-Lipomycin verständlich.

Insgesamt bleiben im ^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins einige Ungereimtheiten, insbesondere die ins Auge fallende Aufspaltung einiger Signale. Die für komplizierte Naturstoffe wichtigen ^{13}C-NMR-Untersuchungen sollten deshalb mit unpolareren ß-Lipomycin-derivaten fortgesetzt werden.

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse

1) Die neuen polyenartigen, lipophilen Antibiotika α-und ß-Lipomycin wurden aus dem Mycèl von Streptomyces aureofaciens (Stamm Tü 117) isoliert, durch Chromatographie an CM-Cellulose und Oxalsäure-Kieselgel gereinigt und durch ihre chemischen Eigenschaften und mit Hilfe von spektroskopischen Daten charakterisiert.

2) α-Lipomycin (37b) unterscheidet sich von ß-Lipomycin (37b) durch die ß-glykosidisch an C-13 gebundene 2.6-Didesoxy-ribo-hexopyranose D-Digitoxose (3). Dieser Zucker wird als Antibiotica-Baustein erstmals nachgewiesen. Seine Identifizierung gelang durch die Massenspektren der gaschromatographisch getrennten Methylglykosid-trimethylsilyläther, das ^{1}H-NMR-Spektrum (Konformationsananlyse) des Methyl-ß-D-digitoxosids (5), den Vergleich der spez. Drehung von Zucker und ß-Methylglykosid (5) sowie den direkten Vergleich mit authentischer D-Digitoxose.

3) Der Chromophor der Lipomycine ließ sich mit Hilfe der Elektronenspektren aufklären (Vergleich der Lipomycine, von Decahydro-ß-lipomycin und den Lithiumalanat-Reduktionsprodukten des ß-Lipomycins mit Modellsubstanzen). Er enthält eine Pentaenkette, die über eine Carbonylgruppe mit einem 1-Methyl-4-hydroxy-Δ^3-pyrrolinon-(2)-Ring (N-Methyl-tetramsäure) verbunden ist. Für das Triketo-system des Chromophors sind sechs Tautomere (39-44) denkbar.

4) Oxidation von Decahydro-ß-lipomycin (38) mit konz. Salpetersäure lieferte die 2.4-Dimethyl-1.13-tridecan-dicarbonsäure

(20a), mit Chrom (VI)-oxid/Eisessig entstand 10,12,14-Trimethyl-13-oxo-pentadecancarbonsäure (30a). Beide Verbindungen wurden als Methylester gaschromatographisch getrennt (Diastereomeren-Gemische). Ihre Konstitution ergab sich aus den IR-, NMR- und Massenspektren sowie der Tatsache, daß 30a durch Weiteroxidation in 20a und niedere Dicarbonsäuren übergeht. 30a und 20a beweisen die Struktur der Pentaen-Seitenkette des ß-Lipomycins (37a).

5) Ozonabbau des ß-Lipomycins (37a) und nachfolgende saure Hydrolyse führten zu N-Methyl-glutaminsäure (33), die durch die Retentionszeit und das Massenspektrum von N-Methyl-N-trifluoracetyl-glutaminsäure-di-n-butylester (35) identifiziert wurde. Aus 33 folgt, daß der N-Methyl-tetramsäure-Ring des ß-Lipomycins (37a) eine Carboxy-äthyl-Seitenkette trägt.

6) Das ^{1}H-NMR-Spektrum und das ^{13}C-NMR-Spektrum des ß-Lipomycins (37a) sowie das Massenspektrum von ß-Lipomycin-methylester (37c) werden diskutiert. Die Spektren stehen mit der durch chemischen Abbau bewiesenen Struktur im Einklang.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeines

Schmelzpunkte :

Alle Schmelzpunkte wurden im Berl-Block in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert.

Spektren :

Die abgebildeten oder erwähnten Spektren wurden in folgenden Geräten gemessen :

Elektronenspektren : Zeiss DMR 21

IR-Spektren (KBr-Preßlinge) : Perkin Elmer Modell 21

^{1}H-NMR-Spektren : Varian HA 100, Tetramethylsilan als innerer Standard, chemische Verschiebungen in δ-Werten (S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett, M = Multiplett)

PFT ^{13}C-NMR-Spektren : Bruker B-KR-322s/4-60 MHz 22.63 MHz, Hexafluorbenzol als externer Standard ; Chemische Verschiebungen in δ-Werten (δ_{TMS} = 0 ppm, δ_{CHCl_3} = 77,2 ppm)

Massenspektren : Atlas CH-4, (direkter Einlaß, Ionenquelle 70 eV, 90–100°)

Varian MAT SM-1-B, (direkter Einlaß, Ionenquelle 70 eV) Hochauflösung mit Perfluor-kerosin als Vergleichssubstanz

Varian MAT CH-7 (Ionenquelle 70 eV, 110°) gekoppelt mit Gaschromatograph Varian Aerograph 1700

Gaschromatographie :

Verwendet wurde ein präparativer Gaschromatograph Perkin Elmer F 21 zu analytischen und präparativen Trennungen.

Molekulargewichte (osmometrisch) :

Dampfdruck-Osmometer Mechrolab Modell 301 A (Benzil als Eichsubstanz)

Drehwerte : Polarimeter Perkin Elmer Modell 141

0, 5 n Oxalsäure-Kieselgel:

1kg Kieselgel (Merck , unter 0, 08 mm) wurde mit 2 l 0,5 n Oxalsäure verrührt, in 3-4 cm dicker Schicht 24 Stdn. bei 110° getrocknet, gepulvert und 3 Stdn. bei 110° aktiviert.

Carboxymethyl-Cellulose

In Wasser vorgequollene CM-Cellulose für Säulenchromatographie (Serva p. a.) wurde abgesaugt, mit 1 n HCl aufgerührt, nach 1 Stde. Stehenlassen abgesaugt und mit Wasser chloridfrei gewaschen. Die feuchte CM-Cellulose schlämmte man mit Aceton in das Chromatographierohr ein und wusch mit Aceton und dann mit dem doppelten Säulenvolumen Chloroform, 1% Methanol nach.

Dünnschichtchromatographie

35 g Kieselgel G (Merck) wurde mit 70 ml 0, 5 n Oxalsäure aufgeschlämmt und in 0, 25 mm Schichtdicke mit dem Desaga-Streichgerät auf 10 Glasplatten (10 x 20 cm) aufgetragen. Die luftrockenen Platten aktivierte man 1 Stde. im Trockenschrank bei 110°.

Ätherische Diazomethanlösung

50 g N-Tolyl-sulfonyl-N-methyl-nitrosamid (Merck) in 480 ccm Äther versetzte man unter Eiskühlung mit einer Lösung von 24 g Kaliumhydroxid in 80 ccm Glykolmonomethyläther, brachte durch Umschwenken und vorsichtiges Erwärmen die Reaktion in Gang und destillierte das Diazomethan schließlich bei 40° zusammen mit dem Äther in eine eisgekühlte Vorlage. Man erhielt so 350 ccm einer etwa 0,4 molaren ätherischen Diazomethanlösung.

B. Beschreibung der Versuche

Kultivierung von Streptomyces aureofaciens (Stamm Tü 117) :

Der Stamm Tü 117 wurde auf M_2-Agar (1% Malz extrakt, 0,4% Dextrose, 0,4% Hefeextrakt) vorgezogen. Das von je 4-5 Roux-Kolben mit je 50 ml Wasser abgeschwemmte Mycel diente zur Beimpfung von 120 bzw. 300 l Nährlösung (2% vollfettes Sojamehl, 2% Glycerin ; pH 7). Die Kultivierung erfolgte submers bei 28° bei einer Belüftung von 150 bzw. 300 l Luft pro Min. Als Antischaummittel verwendete man nach Bedarf Niax Polyol PPG 2025 (Union Carbide, Belgien) und zwar meistens 100-200 ml pro 100 l Kulturlösung. Die Aufarbeitung erfolgte nach 2-3 Tagen. Das Mycel hatte dann eine gelbe bis gelbrote Farbe angenommen.

Um den Zeitpunkt maximaler Antibiotika-Konzentration abzupassen, wurden in Abständen Proben entnommen und im Plattendiffusionstest (Bac. subtilis, synthetisches Nährmedium, 6 mm Filterrondelle) und durch Absorptionsmessung bei 466 mμ untersucht. Vor dem Ernten zeigte die Kultur im Plattendiffusionstest Hemmhofdurchmesser von 17-20 mm, bei der Bestimmung der relativen Absorption wurden Extinktionswerte zwischen 800 und 1000 ermittelt (s. Tab. 1).

Bestimmung der relativen Absorption bei 466 mμ :

50 ml der Kulturbrühe wurden mit 5 ml 2n HCl angesäuert und mit 5-10 g Celite und 50 ml Chloroform versetzt. Man schüttelte mehrmals um und filtrierte dann schnell durch eine Filternutsche. Im Filtrat trennten sich Wasserphase und die orangerot gefärbte Chloroformphase, von der 3-4 ml für die Absorptionsmessung bei 466 mμ verwendet wurden.

Aufarbeitung der Kultur :

120 l Kulturbrühe wurden mit Salzsäure auf pH 3-4 eingestellt und mit 5-8 kg Celite verrührt. Dann trennte man in der Filterpresse die festen Anteile ab (Celite und Mycel). Der Filterkuchen wurde dreimal mit 50-60 l Aceton ausgerührt. Die vereinigten, dunkelroten Acetonextrakte brachte man mit konz. NH_3 auf pH = 7-8 und engte im Vakuum ein (Luwa Dünnschichtverdampfer L 82). Es verblieb ein vornehmlich wässriger Rückstand, den man wiederum ansäuerte (pH = 3-4) und dreimal mit jeweils 3-4 l Chloroform ausschüttelte. Die dunkelrote Chloroformphase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei 40° eingeengt. Dabei fielen ca. 1 l dunkelrotes Öl an.

Um Fette und antibiotisch wirksame Substanzen zu trennen, goß man das Öl in 20 l Petroläther. Nach einer Stde. filtrierte man vom ausgefallenen Rohprodukt, löste dies in 250 ml Chloroform und fällte es wiederum durch Hinzufügen von 4 l Petroläther. Letzte Reste an Fett entfernte man nach Verreiben mit Seesand in einer Soxhleth-Apparatur mit Petroläther (24 Stdn.). Anschließende Extraktion mit Chloroform lieferte nach Verdampfen des Lösungsmittels 12 g eines amorphen rotbraunen Rohprodukts (Roh-Lipomycin).

Elektronenspektrum : $E^{1\%}_{1\ cm}$ (466 mμ) = 423
Plattendiffusionstest : 24 mm Hemmhofdurchmesser (1 mg/ml)

Trennung von Roh-Lipomycin an CM-Cellulose

Je 6 g Roh-Lipomycin wurden in 35 ml Chloroform gelöst und auf eine 7x60 cm-Säule aus CM-Cellulose aufgetragen. Dann eluierte man mit Chloroform/Methanol (99:1) bei einer Durch-

flußgeschwindigkeit von 60 ml/Min. . Nach zwei bis drei Tagen waren mehrere Vorzonen am Säulenende ausgelaufen, und die Säule zeigte zwei breite rote Zonen (bei 20 und 50 cm, vom Säulenkopf an gemessen). Der Inhaltsstoff dieser Zonen, ebenso der am Säulenkopf verbliebene Anteil wurde nach Ausstoßen und Zerschneiden des Celluloseträgers mit Methanol eluiert. Im Gegensatz zu den Vorzonen, die ölige Substanzen enthielten, fielen nach Eindampfen der Methanolextrakte feste rotbraune Rohprodukte an.

Ausbeuten der CM-Cellulose Trennung :

	Farbe	Elutions-volumen	Gewicht (g)	Plattentest (1 mg/ml)
1. 3 Vorzonen	gelb	2,5 l	0,530 (ölig)	- - - -
2. 1 Vorzone +)	rot	3,5 l	0,655 (ölig)	17 mm
3. Hauptzone II 1)	rot	Säulen-inhalt ausgestoßen, zerschnitten u. mit MeOH eluiert	1,799 (fest)	27 mm
4. Hauptzone I 2)	rot		2,383 (fest)	27 mm
5. Kopfzone +)	dunkel-braun		5,910 (fest)	24 mm

+) enthält dem DC nach geringe Mengen α- bzw. ß-Lipomycin

1) enthält überwiegend ß-Lipomycin (ß-CM-Rohprodukt)

2) enthält α-Lipomycin (α-CM-Rohprodukt)

Die α- und ß-CM-Rohprodukte (aus Hauptzone I und II) erreichten bei verschieden Trennungen $E^{1\%}_{1\,cm}$ - Werte zwischen 578 und 750 .

Reinigung von α-Lipomycin (37b) durch Verteilung :

In einer Verteilungsapparatur (Desaga-Ronor, 400 Kammern) trennte man 1, 94 g α-CM-Rohprodukt (in 35 ml Oberphase gelöst) im System Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/Ligroin/Methanol/Wasser (55 :35 :10 :64 :16) unter folgenden Bedingungen : 18°, 20 UpM, 28 ml/Stde. Durchlauf, V_s (stationäre Phase) = 3830 ml, V_m (mobile Phase) = 720 ml. Von der durchlaufenden Oberphase (7 ml-Fraktionen) wurde jede fünfte Fraktion im Plattendiffusionstest geprüft.

2, 6 l Vorlauf enthielten 600 mg inaktive Komponenten (ab 0, 3 l gefärbt). Das gelbrote Eluat 2, 7–4, 4 l hatte ein Aktivitätsmaximum bei 3, 43 l (V_{max}). Die Konzentration an α-Lipomycin bei V_{max} betrug 1, 4 mg/ml (c_{max}). Die Verteilungskurve (Hemmhofdurchmesser gegen ml Eluat) war nahezu symmetrisch. Für α-Lipomycin ergab sich ein Verteilungskoeffizient K = 1, 4, die Zahl der bei der Trennung wirksamen Kammern betrug 127 (32% Wirkungsgrad).

Ausbeute : 1, 07 g 37b (α-Lipomycin-V)

Das im Eluat 3, 2–3, 65 l enthaltene 37b (0, 5 g) wurde in 3 ml Chloroform gelöst und durch Eintropfen in 100 ml Cyclohexan ausgefällt (gelbrotes amorphes Pulver) und 24 Stdn. bei 35° im Hochvakuum getrocknet. Das Dünnschichtchromatogramm (Oxalsäure-Kieselgel G, Benzol/Äther/Aceton = 9 :9 :2) zeigte wenig ß-Lipomycin (gelbrote Vorzone) und braungelbe Produkte am Startfleck als Verunreinigungen. Im Plattendiffusionstest gaben Lösungen von 1 mg/ml Hemmzonen von 30 mm Durchmesser.

Elektronenspektrum ($CHCl_3$) : λ_{max} 265 (240) = 466 mμ ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 906) .305, 274, (s. Tab. 5 S. 48)

Gef. C 64, 76 H 7, 55 N 2, 37 Mol.-Gew. : 1060 (osmometrisch)

Gesamtausbeute: 12 g Rohlipomycin lieferten 2,38 g α-CM-Rohprodukt, aus denen sich durch Verteilung 1,32 g α-Lipomycin-V 37b abtrennen ließen (11 mg pro Liter Kulturlösung).

Reinigung von α-Lipomycin (37b) durch Adsorption:

200 mg α-CM-Rohprodukt chromatographierte man an Oxalsäure-Kieselgel (Säule 35 x 4,7 cm) im System Benzol/Äther/Aceton (9:9:2) (mit Oxalsäure gesättigt). Es bildeten sich folgende Zonen (von unten beziffert): 1) gelber Vorlauf, 2) langgezogene gelbrote Zone (ß-Lipomycin 37a), 3) gelbrote Hauptzone (α-Lipomycin 37b), gelber Nachlauf und gelbbraune Produkte am Kopf der Säule. Da Zone 2 und 3 ohne Trennung ineinander übergingen, wurde das Eluat der Hauptzone fraktioniert aufgefangen und nur die Fraktionen vereinigt, die im Dünnschichtchromatogramm (Oxalsäure-Kieselgel G, Laufmittel wie oben) einheitlich waren.

Ausbeute: 65 mg 37b, dem nur noch Spuren ß-Lipomycin (37a) beigemengt waren. Zur Analyse fällte man das Präparat zweimal aus Chloroform/Cyclohexan um und trocknete 72 Stdn. bei 50° im Hochvakuum. Das ziegelrote Pulver sintert ab 105°, die rotbraunen Tröpfchen werden ab 120° ohne zu fließen klar (Zers.).

$[\alpha]_D^{20} = -229^\circ$ (c = 0,1 Methanol)

$C_{30}H_{43}NO_9$ (561,67)	Ber.	C 64,15	H 7,71	N 2,59	O 25,64	
$C_{32}H_{45}NO_9$ (587,71)	Ber.	C 65,40	H 7,71	N 2,38	O 24,50	
$C_{32}H_{45}NO_9 \cdot 1/2\ H_2O$	Ber.	C 64,41	H 7,77	N 2,35	O 25,47	
		(N)-CH_3 2,52		5 (C)-CH_3 12,60		
	Gef.	C 64,30	H 7,56	N 2,38	O 25,31	
		(N)-CH_3 2,44		(C)-CH_3 8,34		

Mol.-Gew.: 1035 (osmometrisch in Chloroform)

Äquival.-Gew.: 302 (Potentiometrische Titration in 90%igem Äthanol mit 0,02 n NaOH)

Elektronenspektrum (Chloroform): λ_{max} = 466 m ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 950)
306 (160), 273 (240), 265 (270)
(s. Tab. 5, S. 48)

IR-Spektrum: Abb. 1, S. 18

^{1}H-NMR-Spektrum: s. Abb. 3, S. 20

α-Lipomycin unterscheidet sich vom α-Lipomycin-methylester lediglich durch das Fehlen des OCH_3-Signals. Unterschiede zum ß-Lipomycin-^{1}H-NMR-Spektrum s. Kap. IV, 2, S. 19

Reinigung von ß-Lipomycin (37a) durch Adsorption:

204 mg ß-CM-Rohprodukt wurden an einer 30 x 4,6 cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel in Chloroform/Aceton (9 : 1, gesättigt mit Oxalsäure) chromatographiert. Die gelbrote Hauptzone enthielt 67 mg 37a, das in 3 ml Chloroform gelöst und durch Eingießen in 100 ml Cyclohexan umgefällt wurde.

Ausbeute: 35 mg gelbrotes Pulver, das ab 85° sinterte und ab 100° rotbraune Tröpfchen lieferte. Zur Analyse wurde 40 Stdn. bei 50° im Hochvak. getrocknet.

$[\alpha]_D^{20} = -176^\circ$ (c = 0,09, Methanol).

$C_{28}H_{37}NO_7$	(499,61)	Ber.	C 67,31	H 7,47	N 2,80	O 22,41
$C_{26}H_{35}NO_6$	(457,57)	Ber.	C 68,25	H 7,71	N 3,06	O 20,98
$C_{26}H_{35}NO_6 \cdot 1/2\ H_2O$		Ber.	C 66,93	H 7,77	N 3,00	O 22,09
			(N)-CH_3 3,22		4 (C)-CH_3 12,88	
		Gef.	C 67,30	H 7,54	N 2,89	O 22,29
			(N)-CH_3 3,01		(C)-CH_3 6,90	

Mol.-Gew. : 880 (osmometrisch in Chloroform)

Äquival.-Gew. : 242 (Potentiometrische Titration in 90%igem Äthanol mit 0,02 n NaOH)

Elektronenspektrum : vergl. Abb. 9 und Tab. 5 auf S. 47 u. 48

IR-Spektrum : vergl. Abb. 1 auf S. 18

^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$) : s. Abb. 2 auf S. 20

Tab. 12 : ^{1}H-NMR-Daten des ß-Lipomycins (37a) in verschiedenen Lösungsmitteln

Zuordnung	Lösungsmittel +)		
	$CDCl_3$	D_6-Aceton	C_6D_6
Hydroxyl-H	8,00 (breit)	- - - -	8,6 (breit)
Olefinprotonen	6,1–7,5	6,2–7,6	6,1–7,5
11-H	5,61 (D, 10)	5,74 (D, 10)	5,57 (D, 10)
13-H	3,76 (M)	3,86 (M)	3,38 (M)
22-H	3,19 (T, 6)	3,15 ++	3,05 (T, 5)
N-CH_3	2,98 (S)	2,99 (S)	2,68 (S)
12-H	2,73 (M)	2,78 (M)	unter 2,68-Signal
C-20 u. C-21-CH_2	2,0–2,5	1,9–2,4	2,21 (breit)
Olefin CH_3 an C-10	1,83 (S)	1,83 (S)	1,73 (S)
14-H	1,73 (M)	1,76 (M)	unter 1,73-Signal
Aliphat-CH_3	siehe Kap. V,4 und Abb. 22a-c		

+) δ-Werte in ppm ; Form des Signals und Kopplungskonstante in Klammern

++) Vier-Linien-Signal, das als X-Teil eines ABX-Spektrums gedeutet werden könnte.

α-Lipomycin-methylester (37d):

Eine Lösung von 200 mg α-CM-Rohprodukt in 30 ml Chloroform versetzte man bei -20° tropfenweise mit äther. Diazomethanlösung und verfolgte die Abnahme des Ausgangsprodukts im Dünnschichtchromatogramm (Oxalsäure-Kieselgel G, Benzol/Äther/Aceton = 9 : 9 : 2). Sobald alles α-Lipomycin umgesetzt war, wurde eingedampft und der Verdampfungsrückstand an einer 40 x 4,0 cm-Säule aus Oxalsäure-Kieselgel in Benzol/Äther/Aceton (9 : 9 : 2) chromatographiert. Es bildete sich eine langgezogene gelbrote Vorzone, die ohne Trennung in die Hauptzone überging. Beim Eluieren der Hauptzone wurden nur die Fraktionen vereinigt, die chromatographisch einheitlich waren (bis auf Spuren ß-Lipomycin-methylester 37c).

Ausbeute: 80 mg 37d, die nach Lösung in heißem Cyclohexan beim Abkühlen amorph wieder ausfielen. Sintert ab 75°, ab 90° rotbraune Tröpfchen. Zur Analyse wurde 48 Stdn. bei 60° im Hochvak. getrocknet.

IR: 1733 CO-Ester, 1686, 1610, 1558/cm (C=O und C=C-Valenzschwingungsbanden)

$C_{31}H_{45}NO_9$	(575,70)	Ber.	C 64,68	H 7,88	N 2,34	CH_3O 5,39
$C_{33}H_{47}NO_9 \cdot 1/2\ H_2O$		Ber.	C 64,89	H 7,92	N 2,29	CH_3O 5,08
		Gef.	C 64,84	H 7,73	N 2,38	CH_3O 5,38

Mol.-Gew.: 601 (Massenspektrum), 580 (osmometrisch in $CHCl_3$)

Elektronenspektrum: vergl. Abb. 9, S. 47 und Tab. 5, S. 48

^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$) s. Abb. 3, S. 20

Das Spektrum enthält mit Ausnahme des OH-Signals die gleichen Signale wie ß-Lipomycin in $CDCl_3$ (vergl. Tab. 12). Zusätzlich erscheinen sechs weitere Signale bei δ = 4,75 ; 4,07 ; 3,60 ; 3,30 ; 1,90-2,15 und 1,27 ppm (vergl. Kap. IV, 2)

ß-Lipomycin-methylester (37c) :

Eine Lösung von 100 mg ß-Lipomycin (37a) in 30 ml Chloroform versetzte man tropfenweise mit äther. Diazomethanlösung bis im Dünnschichtchromatogramm kein Ausgangsprodukt mehr nachweisbar war. Der Verdampfungsrückstand wurde an 0,5 n Oxalsäure -Kieselgel (Säule 35 x 3,2 cm) in Chloroform / 5% Aceton chromatographiert. Der Inhaltsstoff der gelbroten Hauptzone (56 mg) war wenig beständig und ließ sich nur unter Verlusten aus n-Pentan umfällen (gelbrotes Pulver).

IR : 1730, 1684, 1608, 1558/cm (CO- und C=C-Valenzschwingungsbanden)

Elektronenspektrum : (Vergl. Tab. 5, S. 48)

^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$) : wie 37a (Abb. 2, S. 20), jedoch mit 3 H-Methoxylsingulett bei δ= 3,65 ppm

Hochauflösende Massenspektroskopie :

$C_{27}H_{37}NO_6$	Ber. 471,2626	Gef. 471,2620	(Molekül-Ion)
$C_{23}H_{29}NO_5$	Ber. 399,2045	Gef. 399,2040	($M^+ - C_4H_8O$ vergl. Abb. 23, S.110)

Umsetzung von α-Lipomycin (37b) mit Dimethoxypropan :

10 mg 37b wurden in 1 ml Methanol mit 1 Tropfen konz. HCl und 1,25 ml Dimethoxypropan versetzt und 1 Stde. bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde mit 1 Tropfen konz. NH_3 annähernd neutralisiert und bei 35° eingedampft. Den Eindampfrückstand nahm man mit 2-3 ml Chloroform auf, filtrierte und dampfte wiederum ein (Ausbeute 10,5 mg).
Der Rückstand wurde dünnschichtchromatographisch an neutralem Kieselgel G (System : Chloroform/Methanol,95/5) untersucht. Neben einem gelben Startfleck war bei R_F = 0,6 eine Substanz (Methylglykosid) erkennbar, die sich mit methanolischer Schwefelsäure (50%) nach Erhitzen schwarz färbte.

Methanolyse von α-Lipomycin (37b) :

Eine Lösung von 200 mg 37b in 20 ml 0.1 n methanol. Schwefelsäure wurde 4 Stdn. bei Raumtemperatur gehalten, dann mit Wasser verdünnt und mit wässr. Bariumhydroxid-Lösung auf pH = 5,5 gebracht. Das ausgefallene Bariumsulfat war durch anhaftendes Aglykon gelbrot gefärbt und ließ sich durch Zentrifugieren abtrennen. Der Verdampfungsrückstand der überstehenden klaren Lösung (34 mg, blaßgelb) enthielt die Methylglykoside.

Das Aglykon eluierte man vom Bariumsulfat mit Methanol und chromatographierte den Verdampfungsrückstand der Eluate (140 mg) an Oxalsäure-Kieselgel (Säule 28 x 3,6 cm) mit Chloroform/5% Aceton. Die gelbrote Hauptzone enthielt 50 mg ß-Lipomycin-methylester (37c), der in R_F-Wert und spektroskopischen Eigenschaften mit dem durch Diazomethan-Methylierung aus ß-Lipomycin (37a) erhaltenen Präparat identisch war. Bemerkenswert war eine langgezogene rote Zone, die langsamer als

ß-Lipomycin-methylester (37c) wanderte und offenbar beim Chromatographieren aus diesem hervorging. Die Substanz wurde nach Zerschneiden des Adsorbens mit Methanol eluiert und an Oxalsäure-Kieselgel (Säule 20 x 2,5 cm) im System Benzol/Äther/Aceton (9 : 9 : 2) nachgetrennt.

Ausbeute : 2 mg

IR : 1735, 1656, 1548/cm

Elektronenspektrum ($CHCl_3$) : λ_{max} = 517, (Schultern bei 490, 450 und 316), 305, 273, 261, 255, 249 mμ

Cyclohexan : λ_{max} = 501, 470 (Schulter bei 441), 312, 282, 273 mμ.

Isolierung der Methyl-D-digitoxoside :

34 mg Methylglykosid aus 37b chromatographierte man an einer 20 x 2,5 cm-Säule aus Kieselgel (Merck, unter 0,08 mm) in Chloroform/Aceton (1 : 1). Die Trennung in die Methylglykoside I und II wurde im Eluat (5 ml Fraktionen) dünnschichtchromatographisch verfolgt (einheitliche Fraktionen vereinigen). Das zuerst isolierte Methyl-ß-D-digitoxosid (5) fiel als farbloses Öl an (19 mg); es war chromatographisch einheitlich (R_F-Werte s. Tab. 4 S. 36), gab nach Trimethylsilylierung im Gaschromatogramm (I in Abb. 6) einen Peak (t_{dr} = 61,5 Min.) und wanderte im Boratpuffer (0,1 m, pH = 10) in der Elektrophorese (1300 Volt, 1 Stde.) zur Anode (Laufstrecke 5 cm).

$[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ (c = 1,62, Methanol)

Das aus Zone 2 eluierte Methylglykosid II (1,2 mg, farbloses Öl) gab im Dünnschichtchromatogramm in allen Systemen beim Anfärben mit 30%iger Phosphorsäure nur einen Fleck, gaschromatographisch trennte es sich nach Trimethylsilylierung in zwei Substanzen (t_{dr} = 45 und 56 Min., Mengenverhältnis etwa 1 : 3).

D-Digitoxose :

Eine Lösung von 10 mg Methyl-ß-D-digitoxosid (5) (aus 37b) in 19 ml 0,02 n Schwefelsäure hydrolysierte man 1 Stde. bei 60°, stellte mit wässr. Bariumhydroxid-Lösung pH = 5,5 ein, zentrifugierte und brachte die überstehende klare Lösung im Vakuum zur Trockene. Der Verdampfungsrückstand wurde in Aceton gelöst, filtriert und eingedampft.

Ausbeute : 8 mg. Der Zucker gab eine pos. Keller-Kiliani-Reaktion [57] und war den R_F-Werten (Tab. 4 , S.36) nach mit authentischem 3 identisch.

$[\alpha]_D^{20}$ = +41,5° (c = 0,53, Wasser, nach 15 Min. unverändert) ; + 48,3° (c = 0,57, Aceton).

Dünnschichtchromatogramme und Anfärbereagentien :

5–10 µg Zucker oder Methylglykosid wurden punktförmig aufgetragen (in Methanol oder Wasser gelöst) und aufsteigend chromatographiert (10 cm Laufstrecke der Lösungsmittelfront). Die Substanzen wurden mit folgenden Reagentien angefärbt :
1) 30 proz. wässr. Phosphorsäure, 2-5 Min. auf 100° erhitzen (auf den Zusatz von o-Aminophenol wurde verzichtet , da sich Farbe und Farbintensität der Flecken dadurch nicht veränderte) ;
2) Vanillin/Perchlorsäure [58]

Gaschromatographische Trennung :

1–2 mg gut getrocknetes Methylglykosid wurden mit 1,8 ml Pyridin, 0,6 ml Hexamethyldisilazan und 0,2 ml Trimethylchlorsilan versetzt und gut vermischt. Nach zwei Stdn. bei Raumtemperatur brachte man im Vakuum zur Trockene, nahm den Rückstand mit 0,3 ml Cyclohexan auf und gab jeweils 1 µl auf die Trennsäule. (Säule : 1 m V_2A-Rohr, 3 mm Innendurchmesser, 4% Silicon SE-30 auf Chromosorb-W/AW/DMCS (80/90 mesh)

Bedingungen : Einspritzblock : 250°, Säulenofen : 90°, FID : 300° 20 ml/Min. Stickstoffdurchfluß.

Vergleich des α-Lipomycinzuckers mit D-Digitoxose und 2-Desoxy-L-fucose :

10 mg α-Lipomycin (37b), 2 mg D-Digitoxose (Fluka, puriss.) und 2 mg 2-Desoxy-L-fucose (aus Rhodomycin $V^{20)}$) wurden in jeweils 10 ml 0,1 n methanol. Schwefelsäure gelöst. Nach dreistünd. Stehen bei Raumtemperatur brachte man die Lösungen mit wässr. Bariumhydroxid-Lösung auf pH = 5,5, zentrifugierte und befreite den klaren Überstand im Vakuum vom Lösungsmittel. Die im Verdampfungsrückstand enthaltenen Methylglykoside wurden im Dünnschichtchromatogramm und nach Trimethylsilylierung gaschromatographisch untersucht (Tab. 4, S. 36).

α-Lipomycinzucker : t_{dr} = 61,5 Min. (Methylglykosid I (I in Abb. 6), Hauptkomponente, Massenspektrum Abb. 5, Mol.-Gew. aus GC-MS Untersuchung : 306)
56 Min. (Methylglykosid II) und 48 Min. (breiter Peak), Mol.-Gewichte : 306

2-Desoxy-L-fucose : t_{dr} = 76 Min., 59 Min., Hauptkomponente bei 55 Min. (Mol.-Gew. 306, Fragmentierungsmuster wie beim Methylglykosid I)

D-Digitoxose : t_{dr} = 61,5 Min., 55,8 Min. und 45,3 Min (Hauptkomponente)

Reduktion von α-Lipomycin (37b) mit Lithium-aluminium-hydrid :

Eine Lösung von 10 mg 37b in 5 ml absol. Tetrahydrofuran gab man unter Rühren tropfenweise zu einem Gemisch von 10 ml Tetrahydrofuran und 100 mg Lithium-aluminium-hydrid. In verschiedenen Ansätzen wurde die Reaktionslösung 1) 10 Stdn. bei -15°, 2) 15 Min. bei Raumtemperatur gehalten, 3) 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann verdünnte man mit 40 ml Wasser, säuerte mit 2n HCl an und extrahierte dreimal mit Butanol. Die organische Phase (schwach gelbrot) wurde mit Wasser gewaschen und eingedampft. Von den Verdampfungsrückständen nahm man die Elektronenspektren in Chloroform (Abb. 8) und Methanol auf.

Katalytische Hydrierung von α-Lipomycin (37b) :

a) In einer Hydrierapparatur wurden 20 mg Katalysator (10% Palladium auf Aktivkohle) in 40 ml Methanol suspendiert und bei 20° und 753 Torr 1,5 Stde. vorhydriert. Dann gab man 53 mg α-Lipomycin (37b) hinzu und las die Wasserstoffaufnahme zunächst jede Minute und später in größeren Abständen ab. Nach 47 Min. wurde die Hydrierung abgebrochen, der Katalysator abfiltriert und das farblose Filtrat eingedampft, Rückstand : 46 mg.

t (Min.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
aufgen. H_2 (ml)	1	2	3	3,9	4,4	5,5	6	6,4	7	7,4	8
	12	13	14	15	16	17	18	19	33	47	
	8,5	8,8	9,2	9,6	9,9	10	10	10	10	11,3	

b) In einem Kontrollversuch wurden 51,7 mg 37b in Gegenwart von 30 mg Katalysator hydriert. Die Wasserstoffaufnahme war nach 13 Min. (9,7 ml) beendet.

Die verwendeten α-Lipomycin-Proben enthielten ca. 6% Cyclohexan ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 906 statt 950, NMR-Signal bei δ = 1,41 ppm, Integral verglichen mit dem des 5,61-Signals). Berücksichtigt man dies, so findet man als Äquivalentgewicht für a) (10 ml H_2-Aufnahme) 121 und b) (9,7 ml H_2-Aufnahme) 121,5. Daraus wiederum errechnen sich bei fünf Doppelbindungen Mol.-Gewichte von 605 und 607,5 (Mol.-Gew. für 37b: 587; Äquivalentgewicht: 117).

Umsetzung des Hydrierungsprodukts mit Dimethoxypropan:

47,5 mg hydriertes 37b löste man in einer Mischung aus 1 ml Methanol, 3 ml Dimethoxypropan und 0,1 ml konz. HCl und beließ 2 Stdn. bei Raumtemperatur. Danach wurde eingedampft und der Rückstand an neutralem Kieselgel G (Merck) dünnschichtchromatographisch untersucht (System: 5% Aceton in Chloroform). Ansprühen mit methanolischer Schwefelsäure (50%) machte lediglich langgezogene Startflecken sichtbar.

Methylierung des Hydrierungsprodukts mit Diazomethan

Eine Lösung von 497 mg 37b in 100 ml Methanol schüttelte man mit 250 mg Katalysator in einer H_2-Atmosphäre. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wurde filtriert und das farblose Filtrat eingedampft. Die Lösung der Verdampfungsrückstände in 3 ml Methanol wurde mit einem Überschuß ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt und 15 Min. bei Raumtemperatur belassen. Nach Eindampfen chromatographierte man den Rückstand an Dickschichtplatten (20 x 40 cm, neutrales Kieselgel PF 245, Merck, System : Chloroform, 3% Methanol, je 150-160 mg an einer Platte). Die Hauptzone war im UV-Licht bei 254 mμ als dunkler Streifen erkennbar. Die entsprechende Kieselgelmenge wurde abgekratzt, mit Methanol eluiert und anschließend noch einmal chromatographiert. Am Ende fielen 50 mg einer öligen Substanz an.

^{1}H-NMR : δ = 3.62 (3H, S), 2.79 (S), 1.24 (16–18 H, S), 0.90 (M, 12 H)

Hydrierung von ß-Lipomycin (37a) :

a) In Tetrahydrofuran : In einer Mikrohydrierapparatur wurden 15 mg Katalysator (5% Pd auf Bariumsulfat) in 3 ml absol. Tetrahydrofuran[36] 2.5 Stdn. vorhydriert (20°, 746 Torr). Dann gab man 6.35 mg 37b hinzu und verfolgte die Wasserstoffaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit (Hydrierkurve I in Abb. 10). Nach Beendigung der Hydrierung (Aufnahme von 1.59 ml) wurde abfiltriert und eingedampft.

Vom farblosen Rückstand (5.5 mg Decahydro-ß-lipomycin, 38) wurden IR- und UV-Spektrum (Abb. 10a, Tab. 6, S. 59) gemessen.

IR : 3400, 2860, 2730, 1708, 1612/cm .

b) In Eisessig : 20 mg PtO_2 in 3 ml Eisessig wurden 2.5 Stdn. vorhydriert (20°, 746 Torr). Dann gab man 6.49 mg ß-Lipomycin (37a) hinzu und beobachtete die H_2-Aufnahme über insgesamt 16 Stdn. (Ausbeute : 5 mg Perhydro-ß-lipomycin).

Hydrierkurve II in Abb. 10

t (Min.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
aufgen. H_2 (ml)	0.16	0.42	0.69	0.92	1.11	1.31	1.51	1.60	1.68	1.76	1.82

12	13	15	22	32	42	60	88	4Stdn. 27'	16 Stdn.
1.88	1.92	1.99	2.06	2.19	2.36	2.39	2.55	3.04	3.44

UV : Endadsorption

IR : 3350, 2860, 2730, 1670/cm

c) Blindversuch : 20 mg PtO_2 werden unter gleichen Bedingungen in 3 ml Eisessig 2.5 Stdn. vorhydriert. In den drauffolgenden 16 Stdn. fand eine Aufnahme von 0.35 ml H_2 statt.

d) Äquivalentgewichte : Das in a) und b) verwendete 37a enthielt ca. 12% Cyclohexan ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 1110 gegenüber 1260, NMR-Signal bei 1.41 ppm, Integral verglichen mit dem des 5.61-Signals).

Zu a) : Gemäß der Hydrierkurve I in Abb. 10 ist eine Sättigung nach 2 Min. und 1,59 ml H_2-Aufnahme zu beobachten, das entspricht einem Äquivalentgewicht von 104, korrigiert 91.5. Bei fünf Doppelbindungen erhält man ein Mol.-Gew. von 457.5 (37a : 457).

Zu b) : Zwei Schnittpunkte in der Hydrierkurve II, Abb. 10 führen zu Äquivalent-Gew. von 105,5 und 86, korrigiert 92,8 und 76. Dies entspricht fünf und sechs Doppelbindungen (errechnete Mol.-Gew. :

464 und 455, 37a : 457). Unter Abzug des Blindwerts erfolgt über 16 Stdn. eine H_2-Aufnahme von 3.09 ml. Als korrigiertes Äquivalent-Gew. erhält man 46.5, entsprechend ca. 10 Doppelbindungen.

Salpetersäure-Oxidation von Decahydro-ß-lipomycin (38)

a) 192 mg 38 wurden mit 1 ml konz. HNO_3 versetzt und 4 Min. auf 120° erhitzt (abklingende Stickoxidentwicklung). Nach Zugabe von 30-40 ml Wasser extrahierte man dreimal mit 30 ml n-Butanol. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den Rückstand nahm man in 1 ml Methanol auf, versetzte mit überschüss. äther. Diazomethanlösung, brachte im Vak. zur Trockene und trennte das Methylierungsprodukt gaschromatographisch (vgl. Abb. 11).

b) 980 mg 38 wurden mit 3 ml konz. HNO_3 4 Min. bei 120° oxidiert. Die mit Butanol extrahierten Abbausäuren veresterte man wie oben mit Diazomethan.

Ausbeute : 579 mg Estergemisch, dessen analytisches Gaschromatogramm mit dem von Abb. 11 identisch war.

c) Analytische Gaschromatographie : 6 m-Glassäule (3 mm Innendurchmesser) gefüllt mit 3% Butandioladipat (BDA) auf Chromosorb-W/AW/DMCS 80-90 mesh. Einspritzblock und FID : 300°, Säulenofen : 185° (isotherm), 25 ml/Min. Stickstoffdurchfluß.

Tab. 13 : Retentionszeiten im Vergleich zur C-Atomzahl der Abbausäuren-dimethylester (vgl. Abb. 12)

Peak im GC	C-Atomzahl	n +m	Retentionszeit (Min.)	log t_{dr}
H	C_7	n	15,2	1,182
G	C_8	n +1	20	1,3
F	C_9	n +2	27	1,431
E	C_{10}	n +3	36,5	1,562
D	C_{12}	n +5	49,5	1,695
C	C_{13}	n +6	74	1,87
B	C_{15}	n +8	96,5	1,985
A	C_{15}	n +8	102,5	2,01

Zur Aufnahme der Massenspektren im GC/MS-Kombinationsgerät : 3 m-Glasäule (1 mm Innendurchmesser) , 2% BDA auf Chromosorb W, Einspritzblock : 250°, Ofentemperatur : 80° (10 Min. isotherm, dann bis 200° 8°/Min. ansteigend) . Die Massenspektren der zu den Peaks A-H (Abb. 11) gehörenden Substanzen sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

d) Präparative Gaschromatographie : 6 m-Glassäule (3 mm Innendurchmesser) gefüllt mit 7% BDA auf Chromosorb W/AW/DMCS 80-90 mesh. Einspritzblock : 300°, Ofentemperatur : 200° (isotherm), 40 ml/Min. Stickstoffdurchfluß.

Getrennt wurden 507 mg des nach b) erhaltenen Estergemisches mit Hilfe der automatischen Sammelvorrichtung im präparativen Gaschromatographen F 21 (Perkin-Elmer) . Pro Trennung wurden ca. 50 µl Substanzlösung (= 25-30 mg Estergemisch) aufgegeben.

Die zu den Peaks A - D (Abb. 11) gehörenden Dimethylester wurden in Sammelgefäßen (1-4) aufgefangen und aus diesen mit möglichst wenig Chloroform herausgespült. Die Trennung war sehr verlustreich, da die Substanzen Aerosole bildeten, die sich in den Kühlfallen (-40°) nicht niederschlugen.

2.4-Dimethyl-tridecan-1.13-dicarbonsäure-dimethylester (20b)

Diastereomeres A: Die aus Kühlfalle 1 isolierte Substanz (7.5 mg) entsprach Peak A im Gaschromatogramm (t_{dr} = 102.5 Min.) und war der gaschromatographischen Reinheitsprüfung nach zu 10% durch 20b (Diastereomeres B) verunreinigt.

$[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ}$ (c = 0,5 , Methanol).

IR : 1750/cm (CO-Ester).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : vgl. Abb. 14 und Tab. 8.

$C_{17}H_{32}O_4$ (300.4) Mol.-Gew. 300 (bestimmt aus dem Massenspektrum durch das Ion bei m/e = 269 (M^+-31) und das weitere Fragmentierungsmuster, vgl. Abb. 13 und Tab. 7).

Diastereomeres B: Die aus Kühlfalle 2 isolierte Substanz (5.6 mg) entsprach Peak B im Gaschromatogramm (t_{dr} = 96.5 Min.) und war der gaschromatographischen Reinheitsprüfung nach zu 10% durch 20b (Diastereomeres A) verunreinigt.

$[\alpha]_D^{20} = -7.8^{\circ}$ (c = 0.43 , Methanol).

IR : 1750/cm (CO-Ester).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : vgl. Tab. 8 .

$C_{17}H_{32}O_4$ (300.4) Mol.-Gew. 300 (aus dem Massenspektrum).

3-Methyl-dodecan-1,12-dicarbonsäure-dimethylester (19b)

Die aus Kühlfalle 3 isolierte Substanz (5 mg) war gaschromatographisch einheitlich (t_{dr} = 74 Min.) und entsprach Peak C im Gaschromatogramm (Abb. 11).

$[\alpha]_D^{20} = -1,5^o$, (c = 0.3 , Methanol).

IR : 1750/cm (CO-Ester).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : vergl. Tab. 8, kein α-CH_3-Dublett bei δ = 1.13 ppm, δ = 0.92 ppm (3H, D, 6 Hz).

$C_{15}H_{28}O_4$ (272,3) Mol.-Gew. 272 (bestimmt aus dem Massenspektrum durch das Ion bei m/e = 241 ($M^+ - 31$) und das weitere Fragmentierungsmuster, vgl. Tab. 7).

2-Methylundecan-1,11-dicarbonsäure-dimethylester (18b)

Die aus Kühlfalle 4 isolierte Substanz (3,5 mg) war gaschromatographisch einheitlich (t_{dr} = 49.5 Min.) und entsprach Peak D im Gaschromatogramm (Abb. 11)

IR : 1750/cm (CO-Ester)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : vergl. Tab. 8, α-CH_3-Signal bei δ = 1,13 ppm

$C_{14}H_{26}O_4$ (258,2) Mol.-Gew. 258 (bestimmt aus dem Massenspektrum durch das Ion bei m/e = 227 ($M^+ - 31$) und das weitere Fragmentierungsmuster, vgl. Tab. 7).

Reduktion des Abbausäuregemisches zum Alkangemisch

526 mg Decahydro-ß-lipomycin (38) wurden mit HNO_3 oxidiert und die mit Butanol extrahierten Abbausäuren mit Diazomethan verestert. (Ausb. 363 mg). Nachdem gaschromatographisch die

Identität in der Zusammensetzung mit den bisher erhaltenen Gemischen nachgewiesen worden war, wurde das Estergemisch in 15 ml abs. THF gelöst, mit 500 mg $LiAlH_4$ versetzt und 15 Stdn. am Rückfluß gekocht. Dann gab man unter Kühlen 20 ml Wasser und 30 ml 2 n HCl hinzu, engte die Lösung etwas ein und extrahierte dreimal mit etwa 20 ml Butanol. Die Butanolphase wurde eingedampft, zweimal mit wenig Chloroform aufgenommen und wiederum eingedampft. Nach längerem Trocknen im Vak. wog der Rückstand 220 mg.

Zur Herstellung der p-Toluolsulfonsäureester wurde der Rückstand in 0.4 ml Pyridin gelöst und mit 250 mg p-Toluolsulfochlorid versetzt. Die nach einiger Zeit klare Lösung beließ man 3 Stdn. bei Raumtemperatur, fügte unter Kühlung 0.75 ml konz. HCl und 2.5 ml Wasser hinzu und extrahierte dreimal mit 30-40 ml Benzol. Die Benzolphase wurde zweimal mit 2n HCl, einmal mit 2n Sodalösung und einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (330 mg p-Toluolsulfonsäureester) wurde in 10 ml abs. THF gelöst und mit 400 mg $LiAlH_4$ 15 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man versetzte unter Kühlung mit 30 ml Wasser und 30 ml 2n HCl und extrahierte zweimal mit 50 ml Äther. Die Ätherphase wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und bei 25° im Vak. eingedampft. Den Rückstand nahm man in 2 ml n-Pentan auf und gab ihn auf eine kurze Säule (1 x 8 cm) von neutralem Aluminiumoxid (Woelm, Aktivitätsstufe I). Dann wurde mit ca. 40 ml n-Pentan eluiert und das Eluat eingedampft. Es blieb ein Rückstand von 25 mg übrig, der gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht wurde.

Gaschromatographie: 1 m-V_2A-Säule (3 mm Innendurchmesser) 4% Silicon OV - 1 auf Chromosorb-W/AW/DMCS, Einspritzblock und FID: 250°, Säulenofen: 70°, 25 ml/Min. Stickstoffdurchfluß. Säule und Bed. für Kombinationsgerät: 1 m Glasrohr, 1 mm Innen-

durchmesser, 2% Silicon OV-17 auf Chromosorb-W/AW/DMCS, Einspritzblock : 150°, Säulenofen: 65°.

Der Hauptpeak A/B im Gaschromatogramm (Abb. 15) war 2,4-Dimethyltridecan (t_{dr} = 44,5 Min., Mol.-Gew. : 212, Massenspektrum) (23) und wurde durch sein Fragmentierungsmuster im Massenspektrum (Abb. 16) identifiziert.

Chromsäure-Oxidation von Decahydro-ß-lipomycin (38)

a) Eine Lösung 415 mg 38 in 20 ml abs. THF kochte man mit 600 mg $LiAlH_4$ 36 Stdn. am Rückfluß. Unter Kühlung wurden dann 20 ml Wasser und 30 ml 2n HCl zugegeben und nach geringfügigem Einengen der Lösung dreimal mit ca. 20 ml Butanol extrahiert. Den Rückstand des Butanolextrakts (201 mg = ca. 0.43 mMol) versetzte man mit 1.1 g Chrom(VI)-oxid (11 mMol) in 78 ml Eisessig und erhitzte 2 Stdn. auf 60°. Überschüssiges Chrom(VI)-oxid wurde mit verdünnter Na_2SO_3-Lösung reduziert, die Reaktionslösung wurde eingedampft, in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit 20 ml Butanol extrahiert. Der Rückstand (102 mg) der vom Lösungsmittel befreiten Butanolphase wurde mit ätherischer Diazomethan-Lösung verestert und gaschromatographisch getrennt. (1 m V_2A-Säule, 3 mm Innendurchmesser, 4% BDA auf Chromosorb-W/AW/DMCS, Einspitzblock und FID : 300°, Säulenofen : 195°, 25 ml/Min. Stickstoffdurchfluß). Im Gaschromatogramm (Abb. 17) findet man neben dem Dimethylester 20b (Diastereomere A und B) vier neue Peaks (I bis IV) mit längerer Retentionszeit.

Peak	IV	III	II	I	20b (A)	20b (B)
t_{dr} (Min.)	80	73	56	51	38	35

b) Eine Lösung von 85 mg 38 in 10 ml abs. THF wurden mit 140 mg $LiAlH_4$ versetzt und 2 Stdn. am Rückfluß gekocht. Anschließend gab man 20 ml Wasser und 30 ml 2n HCl unter Kühlung hinzu, extrahierte dreimal mit ca. 20 ml Butanol und oxydierte den Rückstand des Butanolextrakts (65 mg = ca. 0.14 mMol) bei 45-50° 1.5 Stdn. mit 350 mg Chrom(VI)-oxid (= 3.5 mMol) in 24.5 ml Eisessig. Nach Zugabe von verd. Na_2SO_3-Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit 20 ml Butanol extrahiert. Die Carbonsäuren des Verdampfungsrückstands ließen sich mit äther. Diazomethanlösung verestern.

Das Gaschromatogramm zeigte neben 20b (A) und 20b (B) die vier neuen Peaks I bis IV (vgl. Abb. 17). Der Größe der Peaks nach beträgt der Anteil von III/IV nur noch 10% im Vergleich zu I/II. Der Anteil von 20b (A/B) ist um ca. 50% geringer.

c) Eine Lösung von 45 mg 38 kochte man in 10 ml abs. THF mit 100 mg $LiAlH_4$ 2 Stdn. am Rückfluß. Nach Zugabe von 20 ml Wasser und 20 ml 2n HCl erhielt man durch Butanolextraktion 35 mg Reduktionsprodukt (= ca. 0.06 mMol) das man mit 500 mg Chrom (VI)-oxid (= 5 mMol) in 35 ml Eisessig 1 Stde. bei 65-70° oxidierte. Der mit ätherischer Diazomethan-Lösung veresterte Butanolextrakt lieferte 15.6 mg Estergemisch.

Der gaschromatographische Vergleich mit den Gemischen, die nach a) und b) erhalten wurden, zeigte, daß der Anteil von 20b (A/B) um das 1.5fache zugenommen hatte, während III/IV wie bei b) nur ca. 10% von I/II ausmachte.

Von den zu I bis IV gehörenden Substanzen wurden die Massenspektren mit dem GC/MS-Kombinationsgerät aufgenommen [+]. Anschließend wurden die nach a), b) und c) erhaltenen Estergemische vereinigt und durch präparative Gaschromatographie getrennt.

Die Substanzen der Peaks I/II sowie III/IV wurden gemeinsam aufgefangen +).

+) Säule und Bedingungen wie bei der Salpetersäure Oxydation.

10,12,14-Trimethyl-13-oxo-pentadecancarbonsäure-methylester (30b)

Die aus Kühlfalle 1 isolierte Substanz (4,5 mg) bestand der gaschromatographischen Reinheitsprüfung nach aus zwei Komponenten (Peak I: t_{dr} = 51 Min., Peak II: t_{dr} = 56 Min.), die identische Massenspektren lieferten (GC/MS-Kombinationsgerät).

IR: 1736/cm (CO-Ester), 1710/cm (CO-Keton)

^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, vgl. Abb. 20): δ = 3,67 (3H, S), 2,73 (2H, M), 2,31 (2H, T, J = 6,5 Hz), 1,65 (S, breit), 1,29 (S, breit), 1,10 (D, J = 6 Hz) und 0,86 (T).

$C_{19}H_{36}O_3$ (312,3) Mol.-Gew. 312 (Massenspektrum, Abb. 18)

Hochauflösung:

m/e = 312 (Molekül-Ion)	$C_{19}H_{36}O_3$	Gef. 312,2668	Ber. 312,2664
m/e = 241 ($M^+ - C_4H_7O$)	$C_{15}H_{29}O_2$	Gef. 241,2161	Ber. 241,2167
m/e = 209 (241-Methanol)	$C_{14}H_{25}O$	Gef. 209,1899	Ber. 209,1905
m/e = 191 (209-Wasser)	$C_{14}H_{23}$	Gef. 191,1801	Ber. 191,179
m/e = 100	$C_6H_{12}O$	Gef. 100,0886	Ber. 100,

11,13,15-Trimethyl-14-oxo-hexadecancarbonsäure-methylester (31b)

Die aus Kühlfalle II isolierte Substanz (3 mg) bestand der gaschromatographischen Reinheitsprüfung nach aus zwei Komponenten. (Peak III : t_{dr} = 73 Min., Peak IV : t_{dr} = 80 Min.), die identische Massenspektren lieferten (GC/MS-Kombinationsgerät).

IR : 1736/cm (CO-Ester), 1710/cm (CO-Keton)

^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$) : δ = 3,67 (3H, S), 1,29 (S), 1,10 (D), 0,86 (T).

$C_{20}H_{38}O_3$ (326,3) Mol.-Gew. 326 (Mol.-Peak im Massenspektrum bei m/e = 326.

Ozonolyse von ß-Lipomycin (37a)

Eine Lösung von 450 mg ß-Lipomycin (37a) in 30 ml Methanol wurde mit 2 n wässr. Ammoniak auf pH = 8 eingestellt und bei -60° ozonisiert. (60 ml ozonhaltiger Sauerstoff/Min., Ozongerät der Firma Argentox, Hamburg, eingestellt auf 100 V, 40 mA). In Abständen von 5-10 Min. entnahm man der Lösung 10-20 µl, verdünnte in einer Küvette mit 3 ml Methanol und beobachtete die Absorption bei 395 mµ. Nach 30 Min. war die langwellige Bande verschwunden, nach 90 Min. zeigte das Spektrum nur noch Endabsorption. Danach wurde die Lösung noch 30 Min. mit reinem Sauerstoff gespült und bei 40° im Vak. eingedampft. Den Rückstand nahm man in 30 ml 2n HCl auf und kochte 8 Stdn. am Rückfluß. Der Eindampfrückstand war im Tüpfeltest ninhydrin-positiv. Man chromatographierte ihn an einer Säule (2,5 x 46 cm) aus Sephadex G 10 mit Wasser als Laufmittel. Das Eluat wurde in Fraktionen von 7-8 ml aufgefangen. Nach 120 ml Vorlauf erschienen 10 Fraktionen mit

ninhydrin-positiver Substanz. Der Inhaltsstoff der Fraktionen 1-4 (30 ml) war im Dünnschichtchromatogramm [DC-Cellulose-Fertigplatten, Merck ; System : n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1)] einheitlich (R_F = 0.32). Die übrigen Fraktionen (5-10) enthielten daneben eine schneller wandernde ninhydrin-positive Substanz (R_F = 0.39) und zunehmend nicht anfärbbare Substanzen, die bei der Chromatographie störten (die Zonen wurden nicht scharf). Die Fraktionen 1-4 wurden vereinigt und eingedampft (Fraktion I) [Ausbeute : 105,5 mg ; NMR : δ = 2.78 (S), $N-CH_3$: 3.65 (M), 2.65 (M), 2.30 ppm (M)] und anschließend noch einmal an Sephadex G 10 getrennt. Einheitliche ninhydrin-positive Substanz fand ich nach 120 ml Vorlauf in drei Fraktionen (20 ml). Ausbeute : 22,5 mg (Fraktion II).

Ausbeute der anderen Fraktionen : 1. Trennung : 5-7 (32ml, 116 mg), 8-10 (30 ml, 146 mg), Nachlauf (50 ml, 30 mg).
2. Trennung : 4-8 (27 ml, 79 mg), Nachlauf (30 ml, 17 mg).

Zur Dünnschichtchromatographie und zur Herstellung der N-Trifluor-acetyl-butylester diente der Inhaltsstoff der Fraktion II (22,5 mg) Er enthielt N-Methyl-glutaminsäure (33), identifiziert durch das Massenspektrum ihres N-Trifluoracetyl-di-n-butylesters (35) (Abb. 22).

33 : $C_6H_{10}NO_4$ (160,2)

35 : $C_{16}H_{26}NO_5F_3$ (369,4) Mol.-Gew. 369 (Massenspektrum vergl. Abb. 22)

Darstellung der N-Trifluoracetyl-n-butylester

5 mg der Substanz aus Fraktion II bzw. 3 mg der betreffenden Aminosäure löste man in 5 ml 1,2 n methanolischer Salzsäure (wasserfrei) und beließ über Nacht bei 30°. Dann wurde bei 40° im Vak. eingedampft, mit wasserfreier 1,2 n butanolischer Salzsäure aufgenommen und 2 Stdn. bei 90° gerührt. Anschließend entfernte man das Lösungsmittel bei 60° im Vak., fügte dem trockenen Rückstand 1 ml Methylenchlorid und 0,2 ml Trifluoracetanhydrid hinzu und engte nach 3 Stdn. bei Raumtemperatur auf 0,1 ml ein. Zur gaschromatographischen Untersuchung dienten 0,2–0,5 µl der Lösung.

Gaschromatographie: 1 m V_2A-Säule (3 mm Innendurchmesser), 4% Silicon-OV-1 auf Chromosorb W/AW/DMCS, 80-90 mesh, Einspritzblock und FID: 250°, Säulenofen: 155° bzw. 100°. Zur Aufnahme der Massenspektren: 1 m Glassäule (1 mm Innendurchmesser) 2% Silicon-OV-17 auf Chromosorb W/AW/DMCS. Einspritzblock: 250°, Säulenofen: 10 Min. 70°, dann 8°/Min. ansteigend bis 200°.

Das Gaschromatogramm des N-Trifluoracetyl-n-butylesters der Abbau-Aminosäure aus Fraktion II zeigte einen symmetrischen Peak bei t_{dr} = 32,2 Min. (Säulenofen: 155°). Er enthält die Hauptkomponente, deren Massenspektrum (Abb. 22) auf N-Trifluoracetyl-n-methylglutaminsäure-di-n-butylester (34) paßt (s. Kap. IV, C, 4). Entsprechend zeigen die Derivate von Glutaminsäure, Valin und N-Methylvalin einen Hauptpeak bei t_{dr} = 26 Min. (Säulenofen: 155°) 24 und 16 Min. (Säulenofen: 100°).

Glutaminsäure:	$C_5H_9NO_4$	aus	$C_{15}H_{24}NO_5F_3$	Mol.-Gew. 355 (aus dem Massenspektrum)
Valin:	$C_5H_{11}NO_2$	aus	$C_{11}H_{18}NO_3F_3$	Mol.-Gew. 269 (aus M^+-101-Ion bei m/e = 168 im Massenspektrum)
N-Methyl-valin:	$C_6H_{13}NO_2$	aus	$C_{12}H_{20}NO_3F_3$	Mol.-Gew. 283 (aus M^+-101-Ion bei m/e = 182 im Massenspektrum)

Literaturverzeichnis

1) H. Zähner und W. K. Maas, Biology of Antibiotics, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1972)

2) B. Kunze, Diplomarbeit, Tübingen 1972

3) C. Djerassi, M. Ishikawa, H. Budzikiewicz, Tetrahedron Letters, 12, 383 (1961)

4) E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, H. M. Richmonds und M. J. Waring: The Molecular Basis of Antibiotic Action, John Wiley u. Sons, London, New York, Sidney, Toronto (1972)

5) C. F. Fox und A. D. Keith, Membrane Molecular Biology, Sinauer Ass. Inc. Publishers, Stamford, Conn. (1972)

6) G. Casinelli, A. Grein, P. Orezzi, P. Penella und A. Sanfilippo, Arch. Mikrobiol. 55, 358 (1967).

7) J. Gyimesi, I. Ott, I. Horvàth, I. Koczka und K. Magyar, J. Antibiot. 24, 779 (1971)

8) H. Arm und R. Signer, Helv. chim Acta, 50, 46 (1967)

9) E. Breitmeier, G. Jung und W. Voelter, Angew. Chemie 83, 659 (1971)

10) G. C. Levy, G. L. Nelson, Carbon-^{13}C-Nuclear Magnetic Resonance, Wiley Interscience, New York (1972)

11) C. J. Carman, A. R. Tarpley jr. und J. H. Goldstein, J. Amer. Chem. Soc. 93, 2864 (1971)

12) M. V. Duch und D. M. Grant, Macromolecules, 3, 165 (1970)

13) A. E. Pierce, Silylation of Org. Compounds, Rockford, 1968

14) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497 (1963)

15) J. Diekmann, J. B. Thomson und C. Djerassi, J. Org. Chem. 32, 3904 (1967)

16) J. M. Richter, M. Vecchi, W. Vetter und W. Walther. Helv. chim. Acta, 50, 364 (1967)

17) K. Heyns, H. F. Grützmacher, H. Scharman und D. Müller, Fortschr. chem. Forsch. 5 , 448 (1966)

18) T. Reichstein und E. Weiss , Advances Carbohydrate Chem. 17, 65 (1966)

19) H. R. Bollinger und T. Reichstein, Helv. chim. Acta, 36, 302 (1953)

20) B. Scheffer, Dissertation, Göttingen 1970

21) R. J. Ferrier und M. T. Singleton, Tetrahedron , 18, 1149 (1962)

22) S. J. Angyal, Angew. Chem. 81, 172 (1969)

23) R. U. Lemieux , Pure Appl. Chem. 25, 527 (1971)

24) E. L. Eliel, Angew. Chem. 84 779 (1972)

25) B. Iselin, T. Reichstein, Helv. chim. Acta 27, 1203 (1944)

26) O. Schindler und T. Reichstein, Helv. chim. Acta 35, 730 (1952)

27) T. A. Payne und W. Zorbach , J. Am. Chem. Soc. 82, 4979 (1960)

28) W. Klyne , Biochem. J. 47 xli (1950)

29) W. D. Celmer, Pure appl. Chem. 28 , 413 (1971)

30) F. Bohlmann und H. J. Mannhardt, Chem. Ber. 89 1307 (1956)

31) W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi und U. Schwieter, Spectroscopic Methods in Carotenoids, 189
ed. O. Isler, Basel, Stuttgart (1971

32) R. Schlegel und H. Thrum, J. Antibiot. 21, 368 (1971)

33) M. Klessinger , Theoret. chim. Acta, 5 , 251 (1966)

34) P. Karrer und P. Banjera , Helv. chim. Acta, 32 1693 (1949)

35) W. Oroshnik und A. D. Mebane, Fortschr. d. Chemie org. Naturstoffe, Bd. 21 (1963) ed. L. Zechmeister

36) E. Schulze, Dissertation, Göttingen 1969

37) C. E. Stickings und R. J. Townsend, Biochem. J. 78, 412 (1961)

38) J. Shoji, S. Shibata, U. Sankawa, H. Taguchi und Y. Shibanuma, Chem. Pharm. Bull (Tokyo) 13, 1240 (1963)

39) F. Bohlmann, E. V. Dehmlow, H. -J. Neuhahn, R. Brand und H. Bethke, Tetrahedron 26, 2199 (1970)

40) R. Ryhage und E. Stenhagen, Arkiv Kemi 14, 497 (1959) und 15, 291 (1960)

41) E. Borowski, J. Zielinsky, T. Ziminsky, L. Falkowski, P. Kolodziejcyk, J. Golik, E. Jereczek und H. Adlercreutz, Tetrahedron Letters 45, 3909 (1970)

42) R. C. Pandey, V. F. German, Y. Nishikawa und K. L. Rinehart jr., J. Am. Chem. Soc. 93, 3738 (1971)

43) R. Ryhage und E. Stenhagen, Arkiv Kemi 15, 26 (1959)

44) Y. Izumi, Angew. Chem. 83, 956 (1971)

45) D. Roach und C. W. Gehrke, J. Chromatography 44, 269 (1969)

46) E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmeier, S. Jessipow, W. A. König und H. Zähner, Helv. chim. Acta 55, 224 (1972)

47) F. A. MacKellar, M. F. Grostic, E. O. Olson, R. J. Wnuk, A. R. Branfman und K. L. Rinehart jr., J. Am. Chem. Soc. 93, 4943 (1971)

48) L. P. Lindemann und J. Q. Adams, Analytical Chemistry 43, 1245 (1971)

49) J. D. Roberts, F. J. Weigert, J. I. Kroschwitz und H. J. Reich, J. Am. Chem. Soc. 92, 1338 (1970)

50) L. M. Jackman und D. P. Kelly, J. Chem. Soc. (B) 1970, 102

51) J. I. Kroschwitz, M. Winokur, H. J. Reich und J. D. Roberts, J. Am. Chem. Soc. 91, 5927 (1969)

52) D. E. Dohrmann, M. Jautelat und J. D. Roberts, J. Org. Chem. 36, 2757 (1971)

53) R. G. Parker und J. D. Roberts, J. Org. Chem. 35, 996 (1970)

54) R. Hagen und J. D. Roberts, J. Am. Chem. Soc. 91, 4504 (1969)

55) D. H. Marr und J. B. Stothers, Can. J. Chem. 43, 596 (1965)

56) J. E. Stothers und P. G. Lauterbur, Can. J. Chem. 42, 563 (1964)

57) J. v. Euw und T. Reichstein, Helv. chim. Acta 31, 883 (1948)

58) A. P. MacLennan, H. M. Randall und D. W. Smith, Anal. Chem, 31, 2020 (1959)

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Spiteller und Herrn Dr. G. Remberg
für die Aufnahme der Massenspektren,
Fräulein E. Pietsch und Herrn U. Leonhardt für die Aufnahme
der ^{1}H-NMR-Spektren,
Herrn Prof. Dr. Wolff und Frau Dr. I. Field von der TU Braun-
schweig für die Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren,
Herrn M. Beller für die Durchführung der Mikroanalysen,
Frau G. Bonneberg und Fräulen H. Thomas für experimentelle
Mitarbeit sowie Herrn S. Uhl, Herrn Müller und Herrn Adami
für die Aufarbeitung eines Großteils der Submersansätze.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren :

Prof. Dr. Dr. e. h. Hans Brockmann, Prof. Dr. P. Boldt,
Prof. Dr. O. Glemser, Prof. Dr. R. Hilsch, Prof. Dr. W. Jost,
Prof. Dr. W. Lüttke, Prof. Dr. N. Pfennig, Prof. Dr. H. G. Schlegel
Prof. Dr. U. Schöllkopf, Prof. Dr. G. Spiteller, Prof. Dr. H. G. Wagner
und Prof. Dr. M. Ziegler.

Lebenslauf

Am 15.12.1944 wurde ich, Kurt Christian Schabacher, als Sohn des Funkoffiziers Max Schabacher und seiner Ehefrau Meta geb. Rangnau in Swinemünde (Pommern) geboren. Wir flohen im Frühjahr 1945 nach Wilhelmshaven, wo ich von Ostern 1951 bis Ostern 1955 die Volksschule in Altengroden besuchte. Ich wechselte dann auf das Humboldt-Gymnasium in Wilhelmshaven über. Im Herbst 1958 verzogen meine Eltern nach Bremen und ich besuchte dort bis zur Reifeprüfung Ostern 1964 das Gymnasium an der Hermann-Böse-Straße. Nach zweijährigem Wehrdienst begann ich im Sommersemester 1966 mit dem Studium der Chemie an der Universität Göttingen. Am 21.10.1968 legte ich nach Beendigung der Grundpraktika die Vordiplom-Prüfung ab. Danach arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Dr. A. Zeeck innerhalb der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Dr. e. h. H. Brockmann an meiner Diplomarbeit mit dem Thema: "Analyse von Fetten aus Streptomyceten" und bestand am 4.2.1970 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker.

Seitdem arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.